

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

ACTION DU MANGANÈSE SUR LE DÉVELOPPEMENT DE L'ASPERGILLUS NIGER

par GABRIEL BERTRAND et M. JAVILLIER.

L'influence favorable exercée sur la croissance des végétaux par l'introduction, même à l'état de traces, dans le sol ou les milieux de culture, de certains éléments chimiques, comme le manganèse, le bore, le zinc, etc., qui ne se rencontrent, en général, dans les plantes qu'en très petites proportions, est démontrée aujourd'hui par de nombreuses expériences, entreprises tant au laboratoire que dans la grande culture. L'emploi de plusieurs de ces éléments, en addition aux engrais ordinaires, a pu, dès lors, être proposée avec succès par l'un de nous qui a désigné ces engrais nouveaux, à cause de leur rôle probable, sous le nom d'*engrais catalytiques* (1). C'est ainsi que le manganèse, principalement à l'état de sulfate ou de carbonate, a déjà pris une place intéressante dans la pratique agricole.

Nous nous sommes demandé si l'influence exercée séparément par divers éléments catalytiques était cumulative, c'est-à-dire s'il était possible, en ajoutant à la fois deux ou trois de ces éléments, d'obtenir des augmentations de récolte supérieures à celles que l'on obtient par l'addition d'un seul. Il y

(1) GAB. BERTRAND, Sur l'emploi favorable du manganèse comme engrais. *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. CXXI, p. 1255; 1905. — Le manganèse dans la nature. *Rev. gén. de Chim.*, t. VIII, p. 205; 1905. — Sur les engrais catalytiques. *Comptes rendus des Congrès de Chim. appliquée de Berlin*, 1903, de Rome, 1906, et de Londres, 1909.

avait là, en effet, un problème de grand intérêt au point de vue théorique comme au point de vue pratique.

Pour arriver à une solution satisfaisante, nous nous sommes adressés, en ce qui concerne la plante, à l'*Aspergillus niger* v. Tieg., et, en ce qui concerne les éléments catalytiques, au zinc et au manganèse. L'*Aspergillus* offre l'avantage de pouvoir être cultivée en toutes saisons et de fournir, en peu de temps, des récoltes assez abondantes et très régulières. En outre, l'influence exercée sur cette moisissure par l'un des éléments que nous nous proposons d'étudier, le zinc, est déjà bien connue depuis les recherches de Raulin (1), étendues et précisées par l'un de nous (2). Quant au manganèse, nous l'avons choisi parce que son action avait été examinée antérieurement par certains auteurs (3). Néanmoins, comme une lecture attentive des travaux publiés à ce dernier sujet faisait naître quelques critiques et ressortir d'importantes lacunes, nous avons dû, avant d'aborder le problème que nous voulions résoudre, reprendre l'étude particulière de l'action du manganèse sur l'*Aspergillus niger*. Ce sont les résultats de cette étude préliminaire que nous donnons dans le présent mémoire.

Au début de ses recherches sur l'alimentation minérale de l'*Aspergillus niger*, en 1863, Raulin considérait le manganèse comme un élément très utile et presque nécessaire au développement de la moisissure (4). Dans la suite, ce savant découvrit l'importance, passée d'abord inaperçue, du fer et du zinc, et il n'obtint plus, avec le manganèse, que des résultats inconstants. « Faut-il en conclure, écrit-il dans sa thèse (5), que les sels de

(1) Etudes chimiques sur la végétation. *Thèse doct. ès sc.* Paris, 1870.

(2) M. JAVILLIER, Sur l'influence favorable de petites doses de zinc sur la végétation du *Sterigmatocystis nigra*. *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. CXLV, p. 1212; 1907. — Sur la fixation du zinc par le *Sterigmatocystis nigra*. *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. CXLVI, p. 363; 1908. — Recherches sur la présence et le rôle du zinc chez les végétaux. *Thèse doct. Sc.*, Paris 1908. — Le zinc chez les plantes. *Ces Annales*, t. XXII, p. 720; 1908.

(3) En particulier, Richards, *Jahresh. wiss. Bot.*, t. XXX, p. 665; 1897; Kanter, *Diss.* Saint-Petersbourg, 1903; Gössl, voir ci après.

(4) Etudes chimiques sur la végétation des Mucédinées, particulièrement de l'*Ascophora nigra*. *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. LVII, p. 228; 1863.

(5) *Thèse citée*, p. 168.

manganèse ont agi par les sels de fer ou de zinc qu'ils pouvaient contenir ou bien que le manganèse remplace le fer (ou même le zinc) physiologiquement, comme il le remplace souvent dans les réactions chimiques? » « J'en sais, ajoute-t-il, me prononcer à cet égard » ; et c'est sans doute par suite de cette indécision que Raulin ne fit pas figurer le manganèse dans la formule définitive de son milieu de culture.

Gössl (1), en 1905, en ajoutant des doses croissantes de sulfate de manganèse à des cultures d'*Aspergillus niger* ou de *Penicillium glaucum*, a obtenu, avec des milieux de composition variable : sucrés, peptonés, glycélinés, des augmentations croissantes de récolte. Toutefois, cet expérimentateur ne s'est pas mis en garde contre les causes d'erreur signalées par Raulin ; il a utilisé des « sels purs » du commerce, sans ajouter s'il avait vérifié leur degré de pureté et, notamment, l'absence complète du zinc dans le sulfate de manganèse.

Les produits dont nous nous sommes servis dans nos propres expériences avaient été examinés au point de vue de la présence du zinc. En ce qui concerne particulièrement le sulfate de manganèse, bien que notre méthode de recherche du zinc (2), appliquée à 10 grammes de sulfate pur de manganèse du commerce, ne nous ait pas apporté la certitude de la présence du zinc (3), il nous a paru utile, dans nos dernières expériences, de le préparer nous-mêmes en partant du permanganate de potassium pur. Le permanganate a d'abord été recristallisé ; les cristaux ont ensuite été dissous et la dissolution traitée par un courant de gaz sulfureux jusqu'à décoloration. Le bioxyde précipité a été lavé à fond par une série de délayages dans l'eau pure (redistillée dans le vide avec un appareil en verre), suivis de centrifugations ; il a été finalement remis en suspension dans l'eau et redissous par un courant d'anhydride sulfureux.

(1) Ueber das Vorkommen des Mangans in der Pflanze. *Beihefte z. bot. Centralbl.*, t. XVIII, 1^{re} partie, p. 119 ; 1905.

(2) *Bull. Soc. chim.*, 4^e série, t. I, p. 63 ; 1907, et t. III, p. 111 ; 1908.

(3) Lorsqu'on précipite la solution de sulfate de manganèse par l'eau oxygénée et l'ammoniaque, l'oxyde de manganèse précipité peut entraîner partie ou totalité du zinc ; lorsqu'il y a une énorme disproportion entre les quantités de manganèse et de zinc, ce dernier n'étant qu'à l'état de traces, on peut alors craindre de ne pas réaliser une complète séparation des éléments en faisant même une série de redissolutions et de reprécipitations.

La liqueur a été concentrée pour faire cristalliser le sulfate de manganèse.

Il importait aussi que les diverses substances chimiques entrant dans la composition du milieu de Raulin fussent exemptes de manganèse. Or, l'examen de ces substances, bien que nous nous adressions à des produits commerciaux purs, nous a montré que plusieurs d'entre elles renfermaient des quantités appréciables de manganèse. C'était le cas, en particulier, pour le carbonate de magnésium et le sulfate ferreux. Devant la difficulté d'éliminer rigoureusement le manganèse de ces deux sels, nous leur avons substitué le sulfate de magnésium et le sulfate ferrico-ammonique, qu'il est plus aisé d'obtenir purs. La formule de Raulin a dû, par suite, subir une modification ; elle est devenue la suivante :

Eau	1.000 gr. »
Sucre	46 gr. 6
Acide tartrique	2 gr. 66
Carbonate de potassium	0 gr. 40
Nitrate d'ammonium	2 gr. 66
Phosphate d'ammonium	0 gr. 40
Sulfate d'ammonium	0 gr. 153
Sulfate de magnésium	0 gr. 710
Alun de fer	0 gr. 081
Silicate de potassium	0 gr. 046

Des recherches entreprises récemment sur des quantités suffisantes de matière première nous ont montré que le nitrate d'ammonium, le phosphate d'ammonium et le saccharose que nous utilisions n'étaient pas non plus rigoureusement exempts de manganèse. Le taux d'impureté était de l'ordre du 100.000.000^e pour le sucre, du 10.000.000^e pour le nitrate d'ammonium, du 1.000.000^e pour le phosphate. Nous devons dire que nos expériences ont été réalisées avec ces corps, mais on voit que la proportion de manganèse qui a pu, de ce chef, être introduite dans les milieux témoins était d'une extrême petitesse, puisqu'elle n'atteignait pas 1/5.000^e de milligramme par 100 cent. cubes de liquide.

Il existait d'ailleurs une autre cause d'introduction de manganèse : c'était l'attaque des vases mêmes de culture par le liquide porté, au moment de la stérilisation, à la température de +120 degrés. Une expérience conduite dans le but d'appré-

cier la quantité de manganèse qui pouvait être introduite par cette voie dans le milieu de culture nous a montré qu'elle atteignait environ le double de la précédente. Naturellement, cette quantité variait avec la richesse du verre en manganèse et sa plus ou moins grande attaquabilité par le milieu de culture. C'est en nous appuyant sur ces causes que nous expliquons la présence de manganèse à l'état de traces très petites et de grandeur variable dans nos cultures-témoins (1).

Nos expériences ont été réalisées dans des conditions diverses, tant au point de vue de la température (27, 31, 32, 33 degrés) que de la nature des vases (matras de 2 litres, fioles coniques de Bohême de 1 litre et demi, flacons cylindriques en verre vert de 500 cent. cubes) et du volume du liquide de culture (100, 250, 500 cent. cubes). Le liquide était réparti dans les récipients, stérilisé par chauffage à $+120$ degrés pendant vingt minutes, ensemencé largement avec les conidies d'une culture récente d'*Aspergillus*; les vases étaient placés dans une chambre thermostat où la température était aussi régulière que possible. En général, on mettait en séries plusieurs témoins et plusieurs vases correspondant à chaque dose de manganèse expérimentée, de façon à atténuer les différences individuelles. Les chiffres donnés dans les tableaux sont alors des moyennes.

POIDS SEC
des récoltes.

Exp. 1. — Matras de 2 litres. Milieu : 250 cent. cubes.	
Temp., $+27$ degrés. Durée de la culture : 6 jours.	
Culture témoin	1 gr. 72
Culture en présence de $1/10.000$ Mn.	2 gr. 65
Exp. 2. — Matras de 2 litres. Milieu : 250 cent. cubes.	
Temp., $+31$ degrés. Durée de la culture : 4 jours.	
Culture témoin	2 gr. 10
Culture en présence de $1/10.000$ Mn.	2 gr. 90
Exp. 3. — Matras de 2 litres. Milieu : 250 cent. cubes.	
Temp., $+33$ degrés. Durée de la culture : 4 jours.	
Culture témoin	1 gr. 70
Culture en présence de $1/2.500$ Mn.	2 gr. 72
Exp. 4. — Fioles coniques de 1 l. $1/2$. Milieu : 250 c. c.	
Temp., $+31$ degrés. Durée de la culture : 4 jours.	
Culture témoin	2 gr. 49
Culture en présence de $1/5.000$	4 gr. 34

(1) Comme on le verra plus loin, les quantités de manganèse dans les cultures témoins ont varié de 1 à 9 millièmes de milligramme.

POIDS SEC
des récoltes.

Exp. 5. — Fioles coniques de 1 l. 1/2. Milieu : 500 c.c.
Temp., + 33 degrés. Durée de la culture : 4 jours.

Culture témoin	3 gr. 40
Culture en présence de 1/2.500 Mn	4 gr. 69

Sept expériences ont été réalisées dans des conditions diverses pour observer l'influence de doses croissantes de man-ganèse et rechercher quelle dose de métal provoque les récoltes les plus abondantes. Il paraîtra suffisant de consigner ici quatre d'entre elles.

POIDS SEC
des récoltes.

Exp. 6. — Matras de 2 litres. Milieu : 250 cent. cubes
Temp., + 32 degrés. Durée de la culture : 4 jours.

Culture témoin	2 gr. 28
Culture en présence de 1/100.000 Mn	2 gr. 98
— — de 1/50.000 Mn	3 gr. 01
— — de 1/25.000 Mn	3 gr. 18
— — de 1/10.000 Mn	3 gr. 31
— — de 1/5.000 Mn	3 gr. 64
— — de 1/1.000 Mn	4 gr. 02
— — de 1/500 Mn	4 gr. 03
— — de 1/250 Mn	3 gr. 82
— — de 1/100 Mn	3 gr. 90
— — de 1/50 Mn	2 gr. 76

Exp. 7. — Fioles coniques de 1 l. 1/2 Milieu : 500 c.c.
Temp., + 33 degrés. Durée de la culture : 100 heures.

Culture témoin	2 gr. 80
Culture en présence de 1/500.000 Mn	2 gr. 88
— — de 1/100.000 Mn	3 gr. 16
— — de 1/50.000 Mn	3 gr. 43
— — de 1/25.000 Mn	3 gr. 55
— — de 1/10.000 Mn	4 gr. 40
— — de 1/5.000 Mn	4 gr. 23
— — de 1/1.000 Mn	3 gr. 75
— — de 1/500 Mn	4 gr. 60

Exp. 8. — Matras de 2 litres. Milieu : 250 cent. cubes.
Temp., + 32 degrés. Durée de la culture : 4 jours.

Culture témoin	1 gr. 33
Culture en présence de 1/500.000 Mn	1 gr. 49
— — de 1/250.000 Mn	1 gr. 63
— — de 1/100.000 Mn	1 gr. 70
— — de 1/25.000 Mn	1 gr. 19
— — de 1/10.000 Mn	2 gr. 38
— — de 1/2.500 Mn	2 gr. 70
— — de 1/500 Mn	2 gr. 76
— — de 1/200 Mn	3 gr. 51
— — de 1/100 Mn	3 gr. 39

Pour donner un aperçu des variations individuelles et

montrer la nécessité d'opérer en séries, nous consignons, à côté des poids moyens, les poids minima et maxima obtenus dans cette expérience.

Exp. 9. — Flacon de 500 cent. cubes. Milieu : 100 cent. cubes. Temp., + 31 degrés. Durée de la culture : 5 jours.

	POIDS		POIDS
	minima.	maxima.	moyens.
Cultures témoins.	0 gr. 585	0 gr. 625	0 gr. 610
Cultures en présence de 1/1.000.000 Mn.	0 gr. 605	0 gr. 680	0 gr. 631
— — — — — de 1/500.000 Mn.	0 gr. 600	0 gr. 680	0 gr. 637
— — — — — de 1/100.000 Mn.	0 gr. 655	0 gr. 700	0 gr. 680
— — — — — de 1/10.000 Mn.	0 gr. 660	0 gr. 750	0 gr. 687
— — — — — de 1/1.000 Mn.	0 gr. 665	0 gr. 735	0 gr. 700
— — — — — de 1/500 Mn.	0 gr. 755	0 gr. 810	0 gr. 782
— — — — — de 1/333 Mn.	0 gr. 735	0 gr. 850	0 gr. 803
— — — — — de 1/200 Mn.	0 gr. 800	1 gr. 045	0 gr. 951
— — — — — de 1/100 Mn.	0 gr. 840	1 gr. 125	0 gr. 982
— — — — — de 1/50	?	»	0 gr. 170

Ces résultats montrent que le manganèse possède réellement une influence favorable sur le développement de l'*Aspergillus niger*. L'existence d'un « zone optima » de concentration, si nette dans le cas du zinc avec l'*Aspergillus* (1), dans celui du bore avec les phanérogames (2), est ici fort imprécise. Les récoltes augmentent d'abord assez vite avec la proportion du manganèse, puis de plus en plus lentement. Elles ne diminuent qu'en présence de très grandes quantités de métal. Mais, à ce moment, il faut sans doute attribuer le fléchissement de la courbe représentative du phénomène plutôt à l'action nuisible d'une trop forte pression osmotique qu'à l'influence, devenue nocive, du manganèse.

L'attention doit donc surtout se porter, au point de vue de la démonstration du rôle favorable exercé par le manganèse, sur les résultats obtenus avec de très petites doses. Dans ce cas, en effet, l'influence adventice des impuretés, s'il en est introduit avec le sel de manganèse, devient tout à fait négligeable. D'autre part, l'augmentation du soufre apporté avec le manganèse n'entre plus en ligne de compte, car il y a déjà, dans les témoins eux-mêmes, un excès important de soufre disponible.

(1) M. JAVILLIER, *Thèse citée*, p. 63-71.

(2) H. AGULHON, Recherches sur la présence et le rôle du bore chez les végétaux. *Thèse doct. ès sc.*, Paris 1910.

Le manganèse possède également une action qui, sans être très marquée, est cependant sensible sur la formation des conidies, autant qu'on en peut juger par la coloration des cultures. Les *Aspergillus* cultivés sur des doses moyennes de ce métal (1/25.000 à 1/1.000) sont, à l'arrêt des cultures, sensiblement plus noires que les *Aspergillus* témoins, d'une part, et les *Aspergillus* plus riches en manganèse, d'autre part.

Il faut nous demander maintenant dans quelle mesure l'*Aspergillus* fixe le manganèse qui lui est offert. Le fixe-t-il en totalité, au moins pour les petites doses, et se comporte-t-il, vis-à-vis de ce métal comme vis-à-vis du zinc ?

Nous avons fait, pour éclairer ce point, des séries de dosages de manganèse dans des mycéliums secs.

MANGANÈSE introduit.	DILUTION du manganèse 1 sur :	POIDS secs.	POIDS des cendres.	MANGANÈSE fixé.	MANGANÈSE p. 100 de matière sèche.
Exp. 5 (*).					
Témoin.	"	3 gr. 40	0 gr. 108	0 mg. 003	0,00008
200 mg.	2.500	4 gr. 69	0 gr. 1479	1 mg. 25	0,0266
Exp. 8.					
Témoin.	"	1 gr. 331	0 gr. 0393	0 mg. 001	0,00006
0 mg. 5	500.000	1 gr. 490	0 gr. 0469	0 mg. 030	0,0020
1 mg.	250.000	1 gr. 635	0 gr. 0526	0 mg. 036	0,0022
2,5	100.000	1 gr. 700	0 gr. 0552	0 mg. 056	0,0032
10	25.000	2 gr. 190	0 gr. 0710	0 mg. 106	0,0048
25	10.000	2 gr. 380	0 gr. 0744	0 mg. 110	0,0050
100	2.500	2 gr. 700	0 gr. 0821	0 mg. 700	0,0238
500	500	2 gr. 765	0 gr. 0907	4 mg. 000	0,145
1.250	200	3 gr. 510	0 gr. 1272	10 mg. 000	0,285
2.500	100	3 gr. 390	0 gr. 1465	22 mg. 000	0,649
Exp. 9.					
Témoin.	"	0 gr. 610	0 gr. 0227	0 mg. 0090	0,0015
0 mg. 1	1.000.000	0 gr. 631	0 gr. 0241	0 mg. 0112	0,0018
0,2	500.000	0 gr. 637	0 gr. 0254	0 mg. 0126	0,0020
1	100.000	0 gr. 680	0 gr. 0256	0 mg. 0182	0,0026
10	10.000	0 gr. 687	0 gr. 0253	0 mg. 104	0,015
100	1.000	0 gr. 710	0 gr. 0253	1 mg. 08	0,154
200	500	0 gr. 782	0 gr. 0294	2 mg. 2	0,24
340	333	0 gr. 803	0 gr. 0317	3 mg. 6	0,448
500	200	0 gr. 951	0 gr. 0385	5 mg. 0	0,526
1.000	100	0 gr. 982	0 gr. 0470	8 mg. 5	0,863
2.000	50	0 gr. 170	0 gr. 0119	1 mg. 06	0,622
(*) Conditions expérimentales précédemment indiquées. Dans la note des <i>Comptes rendus</i> de l'Acad. des Sciences, dont ce mémoire est le développement (t. CLII, p. 225; 1911), les quantités de manganèse fixées ont été, par erreur, réduites de moitié.					

Ceux-ci étaient incinérés; les cendres étaient sulfatées de façon à faire disparaître toute trace de charbon, et le dosage effectué colorimétriquement, après transformation du manganèse en acide permanganique, suivant une technique dont le détail a été donné antérieurement par l'un de nous (1).

Ces résultats prouvent, tout d'abord, que du manganèse est fixé par la plante. Les augmentations de récolte dans les milieux manganésés ne sont pas seulement dues à la présence du manganèse dans le liquide; le métal pénètre dans la cellule, où il joue, sans doute, un rôle actif dans le processus d'assimilation des aliments.

Les quantités de manganèse fixées par la moisissure sont très éloignées de celles qui lui sont offertes; dans aucun des cas ci-dessus, même celui des plus petites doses, et contrairement à ce qui a été observé au sujet du zinc (2), l'*Aspergillus* n'a fixé la totalité du métal. Si l'utilisation du manganèse par les plantes supérieures a lieu de la même manière, on s'explique aisément les effets avantageux obtenus en ajoutant du manganèse à des sols qui en renferment déjà une proportion notable, même sous une forme assimilable.

On voit aussi que les quantités de manganèse fixées sont, à partir d'une certaine dose, sensiblement proportionnelles aux quantités de métal introduites. Dès ce moment, il est vraisemblable que la totalité du manganèse n'est pas physiologiquement utilisée et qu'au moins une partie se fixe sur les membranes, soit par quelque phénomène de teinture, soit par formation d'une combinaison insoluble. On peut se demander aussi quelle part les conidies prennent dans cette fixation; cette part est-elle, proportionnellement à leur poids, plus élevée que celle du mycélium? Il se présente à ce sujet un certain nombre de problèmes que nous étudions actuellement. Mais nous sommes, dès maintenant, suffisamment renseignés sur l'action propre du manganèse pour pouvoir aborder utilement l'étude de l'action simultanée de cet élément et du zinc; c'est ce que nous ferons dans un prochain mémoire.

(1) GAB. BERTRAND, *Bull. Soc. chim.*, 4^e série, t. IX, p. 361; 1914.

(2) M. JAVILLIER, *Thèse citée*, p. 75.

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES SUR LE TYPHUS EXANTHÉMATIQUE

ENTREPRISES A L'INSTITUT PASTEUR DE TUNIS
PENDANT L'ANNÉE 1911

(TROISIÈME MÉMOIRE)

Ce troisième mémoire apporte la constatation d'un fait utile, la sensibilité du cobaye au virus exanthématique. Il contient, en outre, des données nouvelles sur le siège de l'agent inconnu du typhus et sur les conditions de l'immunité vis-à-vis de la maladie expérimentale. Enfin, on y trouvera les résultats de quelques essais thérapeutiques.

I

LE TYPHUS EXPÉRIMENTAL DU COBAYE

par CHARLES NICOLLE, E. CONSEIL et A. CONOR.

Lorsqu'on inocule, dans la cavité péritonéale de plusieurs cobayes d'un même lot, des quantités variables (8, 6, 4, 3, 2 cent. cubes) du sang d'un malade atteint de typhus exanthématique, une part de ces animaux succombe en quelques jours dans l'amaigrissement et l'hypothermie, avec parfois des paralysies; ce sont ceux qui ont reçu les doses les plus élevées. Les autres, au contraire, inoculés de quantités faibles (3, 2 cent. cubes), ne présentent d'ordinaire aucun symptôme apparent, tout au plus une perte de poids peu importante et passagère. Cependant, si l'on prend la température de ces cobayes qui n'ont témoigné d'aucune réaction objective, on constate que, chez certains, non chez tous, il se produit une fièvre de quelques jours, comparable à celle que montrent les singes témoins, inoculés du même sang et atteints du typhus expérimental le plus net.

Ces faits nous avaient frappés au cours de nos travaux de

1910 et nous avons déjà pu nous convaincre de la réalité de l'infection de certains cobayes, inoculés dans ces conditions, par le résultat positif d'un passage de cobaye à singe. Mais d'autres recherches nous absorbaient alors et M. Roux, mis au courant de nos expériences, nous avait très judicieusement conseillé d'en remettre à plus tard l'étude complète et la publication. Nous nous étions contentés d'une allusion à ces faits dans notre précédent mémoire (1).

Nous avons repris en 1911 nos recherches et nous en avons signalé les premiers résultats dans une note à l'*Académie des Sciences* (séance du 6 juin 1911, p. 1632). Ces expériences sont décisives : Sans présenter la grande sensibilité du singe, qui demeure l'animal réactif du typhus exanthématique, le cobaye offre une sensibilité suffisante vis-à-vis de cette infection pour qu'elle puisse être mise utilement à profit dans les recherches expérimentales ultérieures, en particulier pour la conservation du virus.

Le typhus du cobaye se résume en une élévation de la température d'une durée de quelques jours. Sans le secours du thermomètre, la maladie passerait inaperçue. L'incubation en est variable : sept à seize jours. Certains cobayes ne réagissent pas ; d'autres ne présentent qu'une réaction douteuse ; dans les cas les plus nets, la fièvre dure de quatre à onze jours, le thermomètre peut atteindre alors et dépasser 41 degrés. L'examen des courbes reproduites plus loin donnera de la fièvre exanthématique du cobaye une idée plus exacte que ne le ferait une description difficile et oiseuse. Dans quelques cas, on note, à la fin de la période fébrile, un amaigrissement léger ; il n'y a jamais hypothermie consécutive ; le retour intégral à la santé suit immédiatement la chute thermique. Si un grand nombre de nos cobayes sont morts en cours d'expérience, cette terminaison est la conséquence de ponctions cardiaques destinées au prélèvement du sang pour les passages. Deux de ces animaux, cependant, semblent avoir succombé à l'infection : l'un au cinquième jour de la fièvre, l'autre au premier jour de l'apyrexie ; leur autopsie n'a montré aucune lésion apparente

(1) Ces *Annales* : Recherches expérimentales sur le typhus exanthématique entreprises à l'Institut Pasteur de Tunis pendant l'année 1910 (Deuxième mémoire, p. 130 et 136).

des organes. Nous n'avons pratiqué sur aucun cobaye d'examen histologiques du sang.

Il nous a été possible de réaliser deux fois deux passages par cobaye et une fois trois ; nous n'avons pu dépasser ce chiffre, soit que les doses inoculées fussent trop faibles, soit que le virus avec lequel nous opérons ait été trop peu actif. Pour juger la question, il eût fallu employer à chaque passage un plus grand nombre de cobayes que nous ne l'avons fait, une forte proportion de ces animaux ne présentant à l'inoculation qu'une réaction faible et douteuse. Il y a là une précaution indispensable que les expérimentateurs futurs devront connaître et suivre. Il ne nous a pas paru que les passages par cobaye diminuaient ou augmentaient la virulence du sang pour cet animal ou pour le singe.

L'examen des observations qui suivent et du tableau général qui les accompagne démontre que l'infection transmise au cobaye dans nos expériences est bien le typhus ; on y lira en effet qu'au 1^{er} passage le sang d'un malade a contaminé deux cobayes et un singe neufs, mais non un singe vacciné par une atteinte antérieure de typhus ; que le sang d'un des deux cobayes infectés s'est montré virulent pour un singe et a fourni ensuite une longue série de passages alternatifs, par cobayes et singes, et que le singe infecté avec le sang du malade (bonnet 64) a contracté une immunité consécutive vis-à-vis de l'inoculation ultérieure du virus passé par le cobaye. L'ensemble de ces expériences suffit à trancher définitivement la question.

Au total, nos essais nous ont fourni pour la plus longue lignée *10 passages*, représentés par la série suivante : malade, cobaye, singe, cobaye, cobaye, singe, cobaye, singe, singe, cobaye, singe et cobaye. Nous avons interrompu volontairement nos expériences ; au dernier passage par singe, l'activité du virus était la même qu'au début. Nul doute qu'on puisse, au moyen de passages alternatifs par cobayes et singes, conserver indéfiniment le virus exanthématique dans les laboratoires ; cette constatation est de nature à rendre plus commode et moins coûteuse l'étude de la maladie.

Dans le *typhus expérimental du cobaye*, comme dans celui du singe, *le sang est virulent* (de façon constante pour le singe, animal réactif, et souvent aussi pour le cobaye, animal moins

sensible), *du début de la fièvre jusqu'au dernier jour de celle-ci*. En outre, *une expérience nous a montré la présence du virus dans le sang de ceux-là mêmes de nos cobayes qui ne présentaient aucune réaction thermique, au moment où d'autres animaux (singes ou cobayes), inoculés en même temps et avec le même virus, présentaient une fièvre typique*. En effet, le sang du cobaye 73, inoculé du virus du bonnet 70, comme le cobaye 72 et le bonnet chinois 71 qui ont réagi de façon classique, s'est montré virulent au 44^e jour après l'inoculation, en dehors de toute manifestation thermique.

Le fait est trop intéressant dans sa portée générale pour que nous croyions utile d'y insister davantage.

Ce chapitre était rédigé lorsque nous avons eu connaissance des travaux de Gaviño et Girard sur le même sujet. Ils confirment exactement les nôtres; plus heureux cependant, ces savants ont pu réaliser jusqu'à 11 passages par cobaye. Ce résultat est dû peut-être à une plus grande activité du virus de la maladie mexicaine (*Tabardillo*), à tous autres points de vue identique au virus africain; cette différence dans la virulence n'aurait rien que de naturel, le typhus étant probablement en Amérique d'importation relativement récente, tandis que, dans nos régions, où il sévit sur la population autochtone depuis les débuts de l'histoire, la résistance des indigènes, issus de parents si souvent atteints, a pu atténuer ses propriétés pathogènes.

Nos constatations et celles de Gaviño et Girard n'ont rien de comparable aux faits signalés par Pignet (1). Cet auteur expérimentant sur le lapin et le cobaye, avec des poux infectés ou le sang de malades (frictions sur la peau rasée ou inoculation sous-cutanée), a noté des accidents paralytiques, la cachexie et la mort rapide ou lointaine. Il est probable qu'une part de ces accidents relève de l'action toxique du sang humain. Ceux de nos cobayes qui ont reçu des doses trop fortes de sang sont morts en quelques jours, avons-nous dit, de cachexie et d'hypothermie, ainsi que meurent fréquemment les cobayes inoculés de doses semblables de sang humain sain, et c'est au con-

(1) *Soc. de Pathologie exotique*, 8 décembre 1909, p. 561-567.

traire parmi ceux qui ne présentaient rien d'anormal que le thermomètre a permis de déceler l'infection exanthématique. Or, Pignet n'a pas fait d'observations thermiques.

Il est à noter que Ricketts et Wilder ont montré la sensibilité du cobaye au virus de la fièvre tachetée des Montagnes rocheuses, maladie qui n'est pas sans analogie avec le typhus exanthématique.

PIÈCES JUSTIFICATIVES.

Nous ne rapportons ici qu'une seule série d'expériences pratiquées en partant d'un seul malade. Les résultats ont été identiques avec des virus de souches différentes (Epidémies de 1910 et de 1911, Le Djougar et Tunis).

Des expériences antérieures, qu'il nous paraît inutile de rapporter ici, nous avaient prouvé que l'inoculation péritonéale de sang humain normal, à la dose de 2 à 4 cent. cubes, ne donnait au cobaye aucune élévation thermique.

Le malade qui a servi de point de départ à nos expériences se trouvait, au moment où nous avons prélevé sur lui le virus, au 11^e jour d'un typhus exanthématique grave (malade 51, hôpital de la Rabta, pavillon Emile-Roux). Dix passages ont été réalisés avec son virus en alternant, comme il suit, cobayes et singes. Le sang a été dans tous les cas recueilli par ponction cardiaque et les inoculations pratiquées dans la cavité péritonéale des singes et cobayes.

PASSAGE I

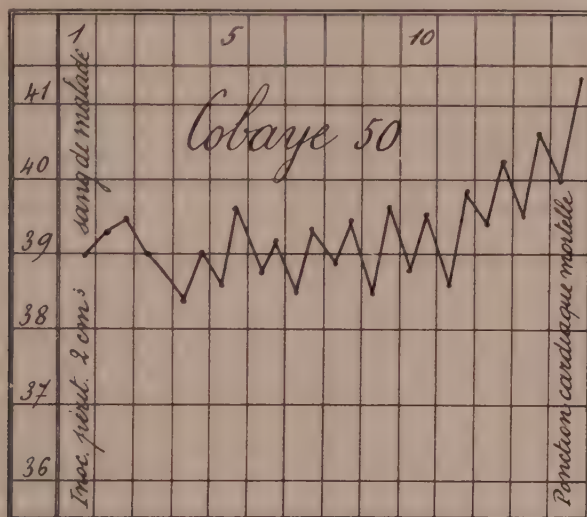
Cobaye 50 (Courbe 1), reçoit, le 17 mars 1911, 2 cent. cubes de sang du malade précédent. La température de ce cobaye, prise deux fois par jour depuis un mois, oscillait de façon régulière entre 38°5 et 39°5.

L'inoculation n'a été suivie chez lui d'aucun symptôme immédiat ; mais, après 10 jours d'incubation, la fièvre s'est élevée progressivement pour atteindre 41°3 au soir du 14^e jour. A ce moment, nous pratiquons sur lui une ponction cardiaque pour l'inoculation du bonnet chinois 70 ; cette ponction est rapidement suivie de la mort du cobaye. En dehors de la température, nous n'avions noté sur lui aucun symptôme ; l'autopsie a donné un résultat négatif.

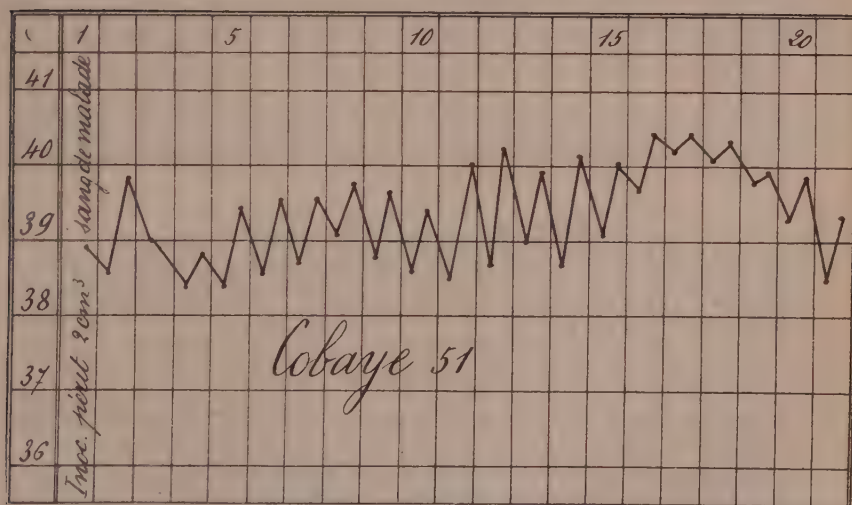
Cobaye 51 (Courbe 2), inoculé en même temps que le cobaye 50, avec une dose identique du même virus.

Ce cobaye a présenté une *reaction fébrile légère* du 15^e au 19^e jour. Réino-

culé le 8 juin, soit 83 jours après la première inoculation, avec le sang du bonnet chinois 88, au 9^e jour d'une infection sévère, il n'a pas réagi



COURBE 1.



COURBE 2.

(Témoins les bonnets 68, 77 et 82 qui ont contracté un typhus classique. Voir plus loin).

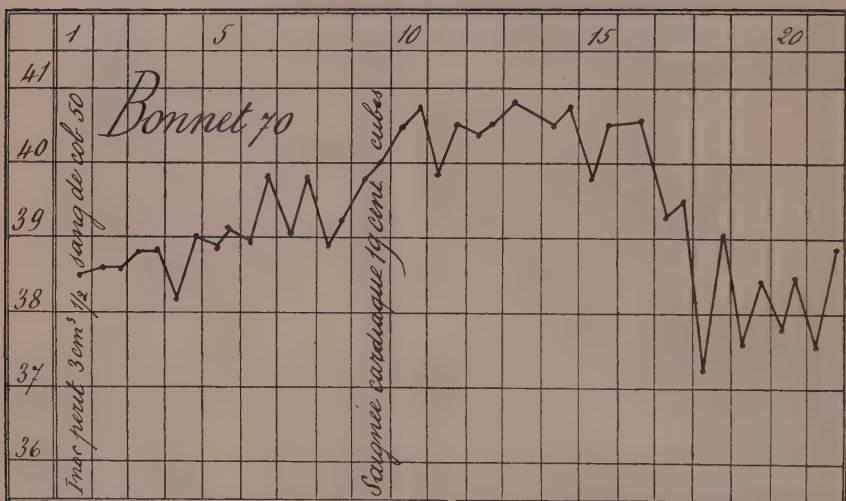
1^{er} Témoin : Bonnet chinois 64, a reçu le même jour 4 cent. cubes de sang

du même malade. *Incubation 6 jours, typhus classique de 10 jours de durée.*

2^e Témoin : Bonnet chinois 42, vacciné par une atteinte antérieure en août 1910, reçoit 5 cent. cubes de sang du malade. *Réaction nulle.*

PASSAGE II

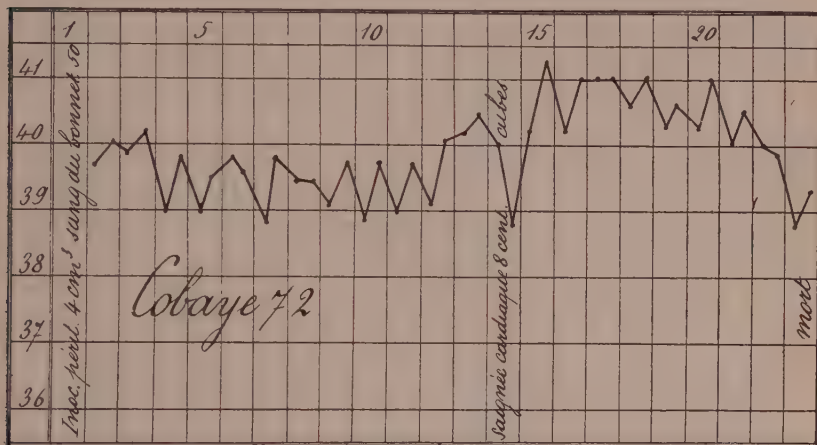
Bonnet chinois 70 (Courbe 3), inoculé le 30 mars avec 3 cent. cubes 1/2 de sang du cobaye 50, prélevé par ponction cardiaque au 4^e jour de son infection (température 41°3). Ce singe a contracté un typhus grave. *Incubation 5 jours, fièvre de 12 jours de durée, suivie de 4 jours d'hypothermie.* Une ponction cardiaque, pratiquée au 4^e jour de l'infection du bonnet chinois 70, a permis



de la température. Le sang prélevé a été utilisé pour l'inoculation des cobayes 78 et 79 et du bonnet chinois 76 (Voir 4^e passage).

Cobaye 75, inoculé en même temps que le cobaye 72 avec une dose identique du même sang. Ce cobaye n'avait présenté aucune réaction thermique, lorsqu'il est mort, au 14^e jour, des suites d'une ponction cardiaque. Nous jugeons inutile de reproduire sa courbe thermométrique absolument normale.

Le sang de cet animal s'est montré virulent pour le bonnet 77 et non pour les cobayes 81 et 89 (Voir plus bas, 4^e passage).



COURBE 4.

Témoin : Bonnet chinois 71, inoculé en même temps que les cobayes 72 et 75 avec 4 cent. cubes de sang du bonnet 70. Incubation 8 jours, typhus très grave d'une durée de 12 jours, suivi d'hypothermie.

PASSAGE IV. — LIGNE ISSUE DU COBAYE 72.

Cobaye 78 (Courbe 5), inoculé le 20 avril avec 2 cent. cubes de sang du cobaye 72 au 3^e jour d'une infection grave.

Incubation de 7 jours, fièvre de 7 jours, aucun autre symptôme ; sacrifié le 1^{er} jour du retour de la température à la normale, pour des expériences qui n'ont donné aucun résultat.

Au 4^e jour de son typhus, ce cobaye a subi une ponction cardiaque pour l'inoculation du bonnet 78 (Voir 5^e passage).

Cobaye 79, inoculé en même temps que le cobaye 78, avec une dose égale du même virus. Incubation 16 jours, fièvre de 7 jours de durée, pas d'hypothermie consécutive.

Le sang de ce cobaye, prélevé le 11^e jour après l'inoculation, 6 jours avant le début de la fièvre, n'a pas infecté le bonnet 79 (inoculation de 5 cent. cubes dans la cavité péritonéale).

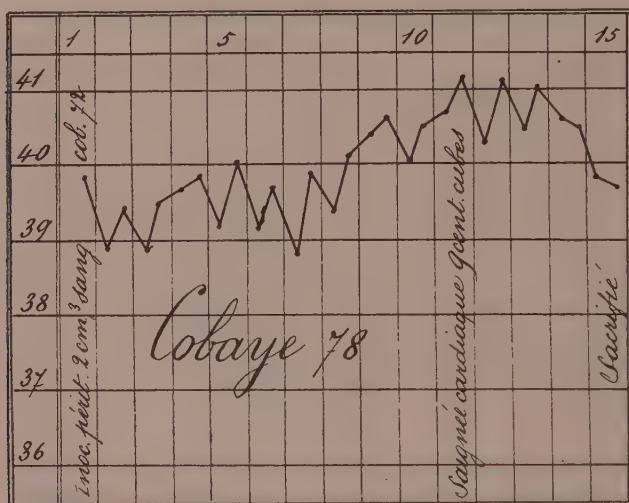
Témoin : Bonnet 76. Inoculation pratiquée dans les mêmes conditions que celles des cobayes 78 et 79 à la dose de 4 cent. cubes de sang.

Incubation de 5 jours; typhus grave terminé accidentellement par la mort, au 6^e jour de la fièvre, à la suite d'une ponction cardiaque.

Le sang de ce singe s'est montré virulent pour le cobaye 91, non pour le cobaye 90 (Voir plus bas, 6^e passage).

LIGNE ISSUE DU COBAYE 75.

Ce cobaye, inoculé avec le sang du bonnet 70, en même temps que le cobaye 72, n'avait, au contraire de ce dernier, présenté aucune élévation thermique. Son sang s'est montré cependant légèrement virulent pour le bonnet 77, et non (de façon apparente du moins) pour les cobayes 81 et 89.



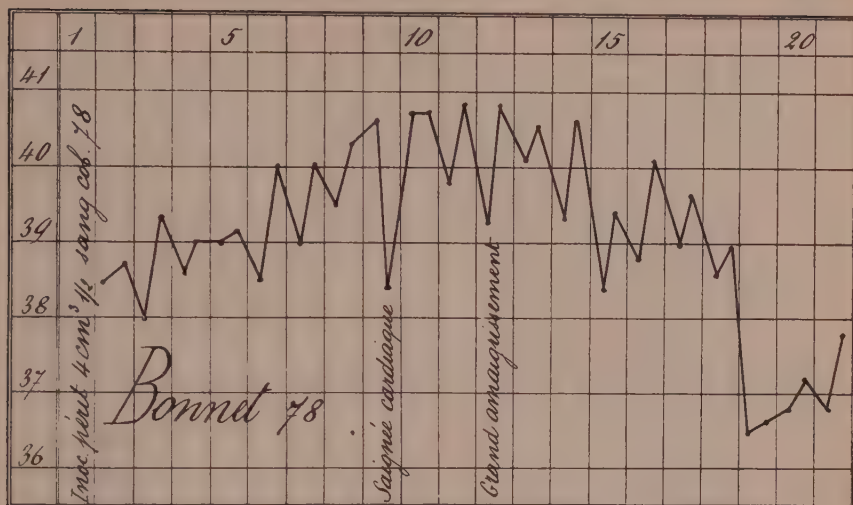
COURBE 5.

Bonnet 77, inoculé, le 20 avril, avec 4 cent. cubes de sang du cobaye 75, prélevé au 14^e jour après l'inoculation. *Incubation 7 jours, typhus léger de 2 jours de durée*, comparable aux infections bénignes notées chez certains singes dans notre mémoire de l'an passé.

Cobayes 81 et 89, inoculés dans les mêmes conditions que le bonnet 77, avec 2 cent. cubes et 3 cent. cubes 1/2 du même sang. *Aucune réaction consécutive*; nous jugeons inutile de reproduire ici leur courbe thermométrique absolument normale.

PASSAGE V. — LIGNE ISSUE DU COBAYE 78.

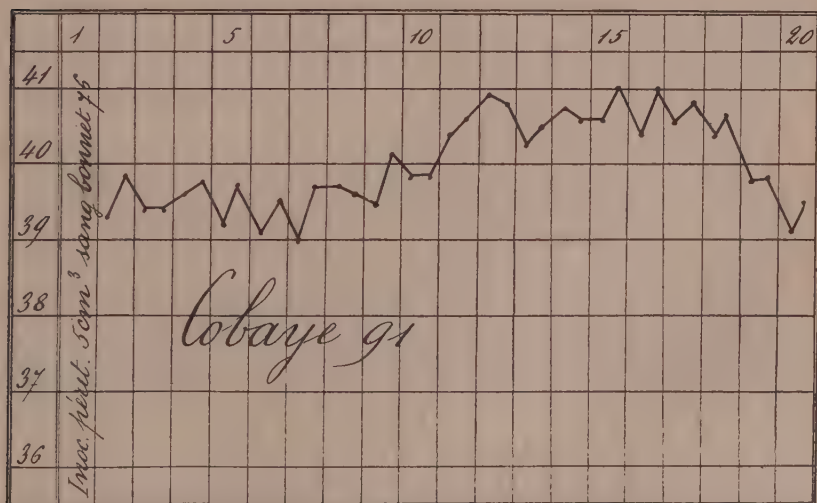
Bonnet 78 (Courbe 6). Ce singe reçoit, le 30 avril, 4 cent. cubes 1/2 de sang du cobaye 78, au 4^e jour de son infection. *Incubation 5 jours, typhus très grave d'une durée de 12 jours*, suivi d'hypothermie et d'un amaigrissement considérable. Le sang du bonnet 78 a servi à l'inoculation du cobaye 100 (Voir plus bas).



COURBE 6.

LIGNE ISSUE DU BONNET 76.

Cobayes 90 et 91 (Courbe 7). De ces deux animaux, inoculés le 30 avril, avec une quantité égale (3 cent. cubes) de sang du bonnet 76, prélevé au 6^e jour de son typhus, l'un, le 90, n'a pas réagi ; l'autre, le 91, a présenté une fièvre de 10 jours de durée, après une incubation de 8 jours.

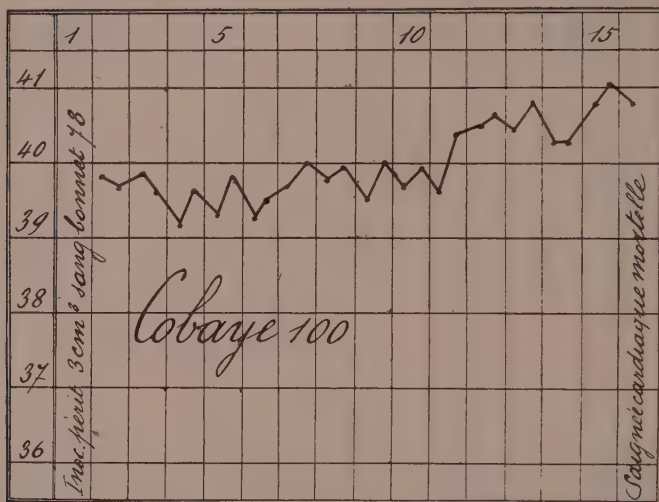


COURBE 7.

PASSAGE VI

Cobaye 100 (Courbe 8), inoculé le 10 mai, avec 3 cent. cubes de sang du bonnet 78, au 6^e jour d'un typhus grave. *Incubation 10 jours, typhus interrompu* le 6^e jour par une saignée cardiaque mortelle de 16 cent. cubes.

Le sang de ce cobaye a servi à inoculer le bonnet 88 et les cobayes 77 et 88.



COURBE 8.

PASSAGE VII

Bonnet 88 (Courbe 9). Ce singe reçoit, le 25 mai, 7 cent. cubes de sang du cobaye 100, au 6^e jour de son infection. *Incubation 4 jours, typhus grave de 11 jours de durée, suivi d'une hypothermie légère.*

Le sang de ce singe, prélevé au 9^e jour de son infection, a servi à inoculer les cobayes 36 et 37, qui n'ont pas réagi, ainsi que plusieurs bonnets chinois neufs ou vaccinés, desquels nous ne retiendrons ici que le bonnet 68, qui a permis la continuation des passages.

Cobaye 77, inoculé, le même jour que le bonnet 88, avec 5 cent. cubes du même sang. *Incubation 11 jours, typhus net de 7 jours.*

Le sang de ce cobaye, prélevé au 7^e et dernier jour de son infection, a été inoculé sans résultat au cobaye 17 et avec un résultat douteux au cobaye 71.

Cobaye 88, inoculé dans les mêmes conditions que le cobaye 77, avec 4 cent. cubes de sang du cobaye 100. *Incubation 8 jours, fièvre légère de 11 jours de durée.*

PASSAGE VIII. — LIGNE DU BONNET 88.

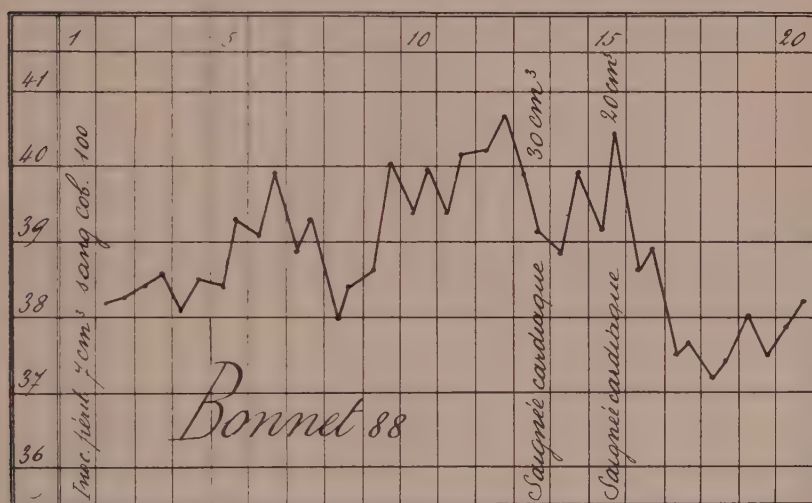
Bonnet 68. Ce singe, non immunisé par une inoculation antérieure et inactive des globules rouges lavés d'un malade atteint de typhus, reçoit, le 6 juin, 5 cent. cubes de sang du cobaye 88, au 9^e jour de sa fièvre. *Incuba-*

tion 11 jours, typhus grave de 8 jours de durée. La courbe thermique de ce singe sera donnée au chapitre III de ce mémoire (Courbe 22).

Le sang de ce singe a été utilisé pour l'inoculation des cobayes 52 et 53 (9^e passage).

Cobaye 36, inoculé le même jour et dans les mêmes conditions que le bonnet 68, avec 3 cent. cubes du même sang. Ce cobaye n'avait présenté aucune réaction thermique, lorsqu'il est mort des suites d'une ponction cardiaque, au 11^e jour après l'inoculation. Un passage, tenté avec son sang (3 cent. cubes) sur le cobaye 92, a donné un résultat négatif.

Cobaye 37, inoculé dans les mêmes conditions que le cobaye 36, avec une même dose du même sang. Ce cobaye n'avait présenté aucune réaction thermique, lorsqu'il est mort, des suites d'une ponction cardiaque, au 18^e jour après l'inoculation. Des passages, tentés avec son sang (2 cent. 1/2 et 3 cent. cubes), sur les cobayes 20 et 26, ont donné des résultats négatifs.



COURBE 9.

Nous croyons inutile de reproduire ici les courbes des cobayes 36 et 37, absolument normales.

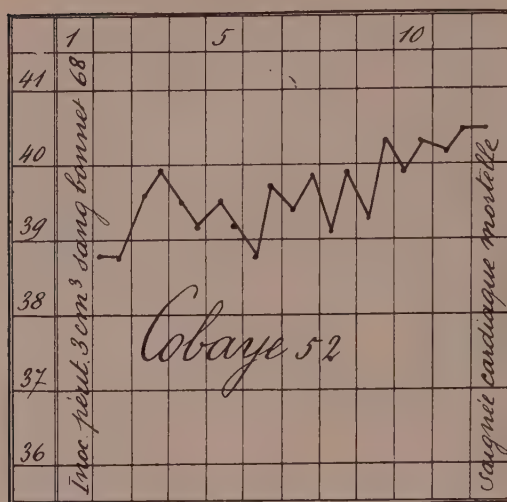
LIGNE DU COBAYE 77.

Cobaye 17. Ce cobaye reçoit, le 11 juin, 3 cent. cubes de sang du cobaye 77, au 7^e jour (dernier) de son infection. *Résultat négatif.*

Cobaye 71, inoculé dans les mêmes conditions et avec une même dose de sang que le cobaye 17. *Très faible élévation thermique du 15^e au 18^e jour.*

PASSAGE IX

Cobaye 52 (courbe 10). Ce cobaye reçoit, le 19 juin, 3 cent. cubes de sang du bonnet chinois 68, au 3^e jour de son infection. *Incubation 8 jours, typhus interrompu, le 4^e jour de la fièvre, par une ponction cardiaque mortelle.*



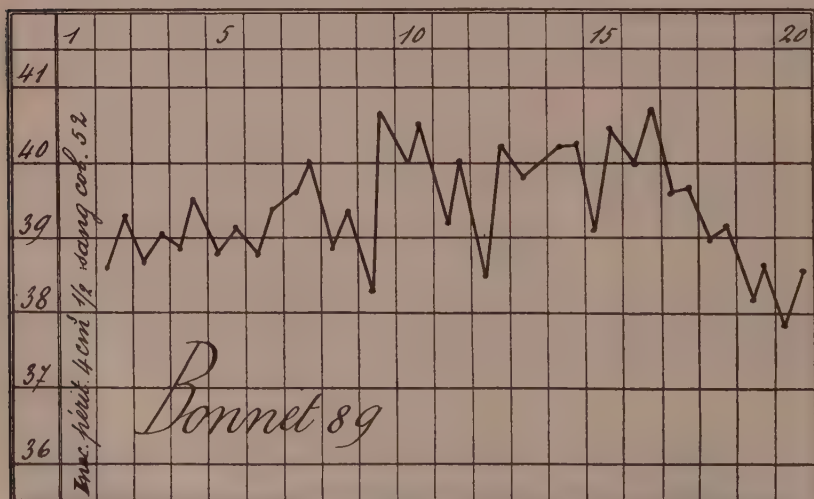
COURBE 10.

Le sang de ce cobaye a été utilisé pour l'inoculation du bonnet 89 et du cobaye 49.

Cobaye 53, inoculé dans les mêmes conditions que le cobaye 52, avec une même dose du même sang. Incubation 10 jours, fièvre de 5 jours, terminée par la mort. Autopsie négative.

PASSAGE X

Bonnet 89 (courbe 11). Ce singe reçoit, le 30 juin, 4 cent. cubes 1/2 de sang



COURBE 11.

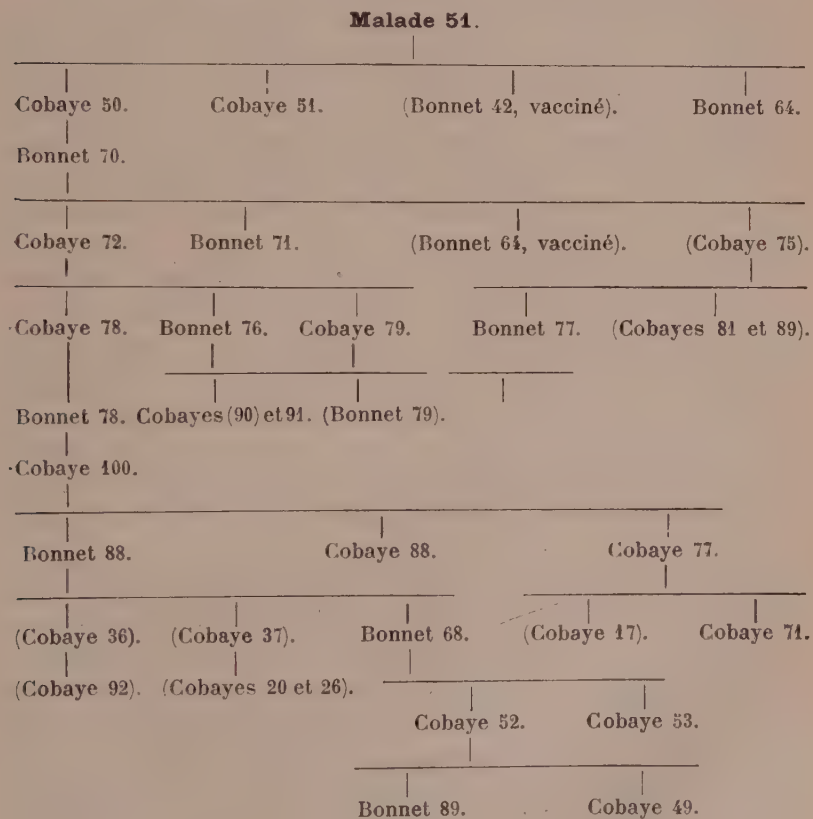
du cobaye 52, au 5^e jour de son infection. *Incubation 8 jours, typhus moyen de 9 jours.*

Cobaye 49, inoculé dans les mêmes conditions que le bonnet 89, avec 1 cent. cube 1/2 de sang du cobaye 52. *Résultat douteux* : élévation de température d'un demi-degré du 8^e au 10^e jour après l'inoculation ; mort le 13^e jour, autopsie négative.

Nous n'avons tenté d'inoculations, ni avec le sang du bonnet 89, ni avec celui du cobaye 49 ; notre série de passages par cobayes et singes s'est donc trouvée de ce fait arrêtée.

TABEAU DES PASSAGES ALTERNATIFS PAR COBAYES ET SINGES

(Les parenthèses indiquent les animaux qui n'ont pas réagi.)



II

DONNÉES EXPÉRIMENTALES NOUVELLES SUR LA NATURE ET LE SIÈGE
DE L'AGENT PATHOGÈNE DU TYPHUS EXANTHÉMATIQUE

par CHARLES NICOLLE, A. CONOR et E. CONSEIL.

Si l'étude expérimentale et l'étiologie du typhus exanthématique ont fait en ces derniers temps d'utiles progrès, notre incertitude est encore grande au sujet de la nature de son agent pathogène. Il est permis d'admettre qu'il s'agit d'un microbe invisible et filtrant; une de nos expériences de l'an passé ne comporte pas d'autre conclusion (Cf. ces *Annales*, 1910, pages 100 et suivantes : Observation du bonnet chinois 47); mais la preuve de cette dernière propriété a été particulièrement délicate à établir, en raison du nombre insuffisant des éléments qui traversent le filtre et de la nécessité d'employer de fortes doses de virus pour obtenir à coup sûr l'infection des animaux sensibles.

Une localisation du microbe exanthématique dans l'intérieur de certaines cellules donnerait de cette difficulté une explication des plus claires, la plupart des microbes demeurant prisonniers dans ces cellules. L'un de nous avait émis, dès 1909, l'hypothèse du siège intraleucocytaire du virus. Des expériences nouvelles, dont nous avons donné, dans une note à l'*Académie des Sciences* (séance du 18 septembre 1911, p. 578), un résumé et les conclusions, viennent à l'appui de cette conception.

Des divers éléments du sang, séparés par centrifugation et lavés, les globules blancs sont, en effet, les plus virulents; une dose minime de ces cellules détermine chez le singe une infection rapide et grave; le plasma, moins actif, semble ne devoir sa virulence qu'aux leucocytes ou débris leucocytaires, dont il est malaisé de le débarrasser complètement; les globules rouges n'ont pas de virulence. D'autre part, le sérum sanguin centrifugé est inoffensif pour l'être le plus sensible au virus exanthématique, l'homme, et une humeur dépourvue de cellules, le liquide céphalorachidien, se montre également inactive.

A. — VIRULENCE COMPARÉE DES DIVERS ÉLÉMENTS DU SANG
SÉPARÉS PAR CENTRIFUGATION ET LAVÉS.

Exp. I. — Le sang utilisé a été prélevé par ponction veineuse sur le malade 120, hôpital de la Rabta, pavillon Murchison, au 7^e jour d'un typhus grave. Aussitôt après sa sortie des vaisseaux, ce sang a été recueilli par fractions de 18 cent. cubes dans des tubes à centrifugation stériles, contenant déjà 2 cent. cubes d'une solution de citrate de soude à 5 p. 100. Sur trois de ces tubes, deux ont été centrifugés pendant douze minutes, le troisième laissé de côté avec son contenu. La centrifugation terminée, nous avons, de suite, prélevé quelques cent. cubes de plasma à la partie supérieure des tubes. D'autre part, la couche leucocytaire a été recueillie avec soin au moyen d'un pinceau, fait de petites languettes de caoutchouc, et additionnée d'eau physiologique à 8 p. 1000 ; quelques centimètres cubes de globules rouges ont été prélevés ensuite à la partie la plus profonde des tubes et additionnés du même liquide. Ces manipulations très minutieuses ont demandé vingt-deux minutes. Après cela, globules blancs et globules rouges en suspension dans l'eau physiologique ont été soumis à une seconde centrifugation de dix minutes de durée. Celle-ci terminée, il nous a fallu six minutes encore pour séparer les cellules du liquide dans lequel on les avait lavées. Il s'est donc écoulé, au total, cinquante minutes entre le prélèvement du sang et les inoculations. Celles-ci ont été pratiquées dans la cavité péritonéale de bonnets chinois, ainsi qu'il suit :

Le *bonnet* 81 a reçu 5 cent. cubes de sang complet citraté (c'est-à-dire en contact avec le citrate de soude aussi longtemps qu'ont duré les manipulations).

Le *bonnet* 82 : 5 cent. cubes de plasma citraté.

Le *bonnet* 83 : 2 cent. cubes et demi de globules rouges centrifugés et lavés.

Le *bonnet* 84 : 1 millimètre cube environ de la couche leucocytaire obtenue par centrifugation et lavée. Examiné à l'ultramicroscope, ce produit montre plus de globules rouges que de globules blancs ; le chiffre de ceux-ci atteint au plus le quart ou le cinquième du total.

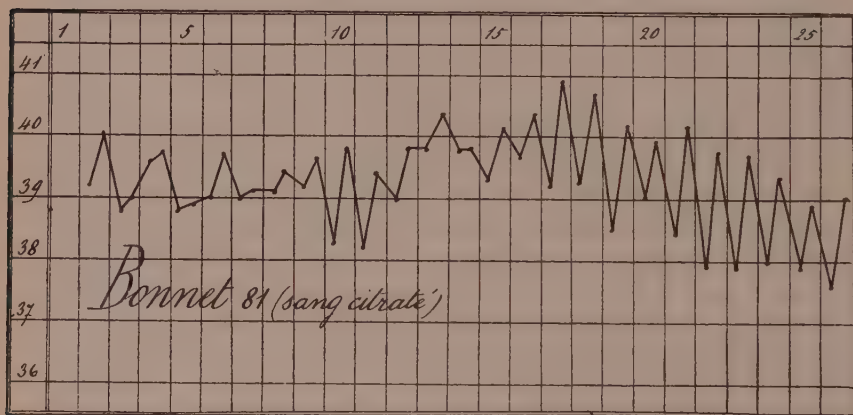
Nous avons pris soin auparavant d'inoculer dès le moment de la récolte du sang, avec une dose uniforme de 4 cent. cubes et demi de ce produit, un *bonnet chinois témoin* (57) et deux autres *bonnets* (62 et 71), vaccinés par une atteinte antérieure.

Les résultats de cette expérience ont été les suivants :

Bonnet 57, témoin (sang frais). Incubation 16 jours, typhus moyen de 12 jours de durée. La température de ce singe dépasse 40 degrés pendant 6 jours. La longue durée de l'incubation chez ce singe est due à un degré appréciable, quoique insuffisant, de résistance, qu'expliquent ses antécédents. (Cf. à ce sujet l'observation et la courbe de cet animal au Chapitre suivant : Expériences relatives à l'immunité.)

Bonnets 62 et 71, vaccinés (sang frais). Néant. (Voir leurs observations au même Chapitre.)

Bonnet 81 (sang citraté). Incubation 12 jours, typhus moyen de 9 jours, la température dépasse 40 degrés pendant 7 jours (Courbe 12).

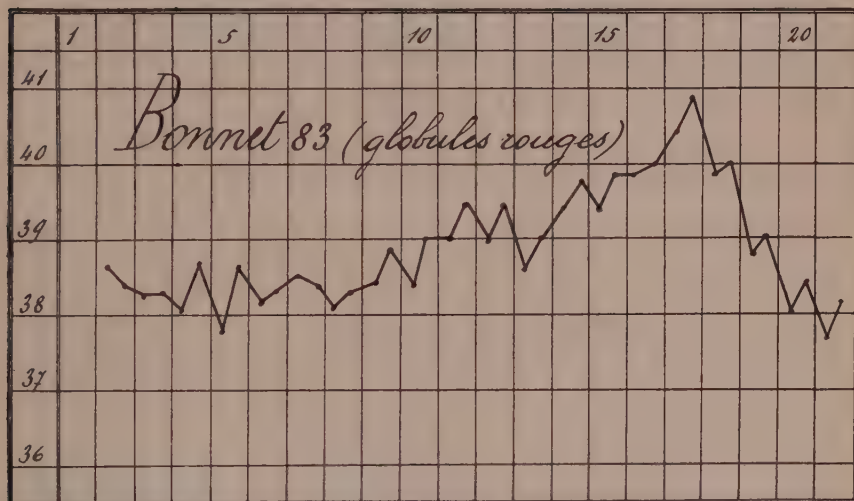
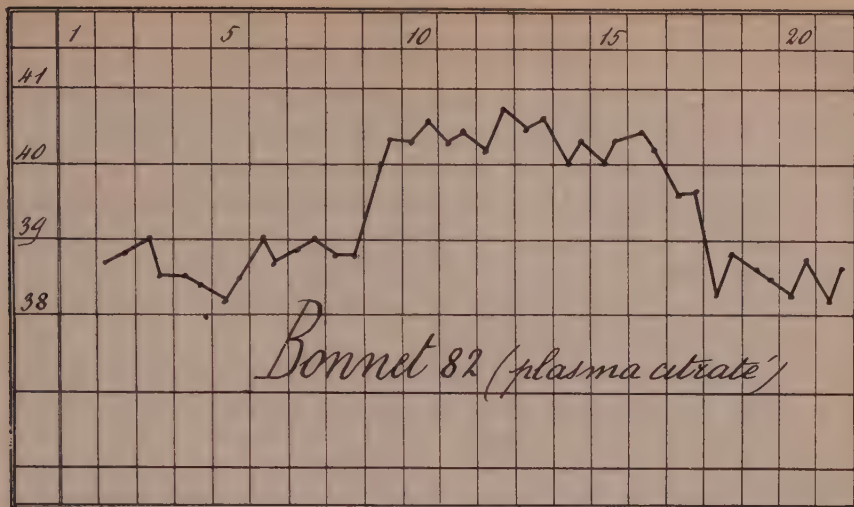


COURBE 12.

Bonnet 82 (plasma citraté). Incubation 8 jours, typhus de 9 jours de durée. La température dépasse 40 degrés pendant 6 jours (Courbe 13).

Bonnet 83 (globules rouges). Incubation 13 jours, typhus abortif de 5 jours. La température atteint 40 degrés pendant 2 jours et les dépasse une seule fois (Courbe 14).

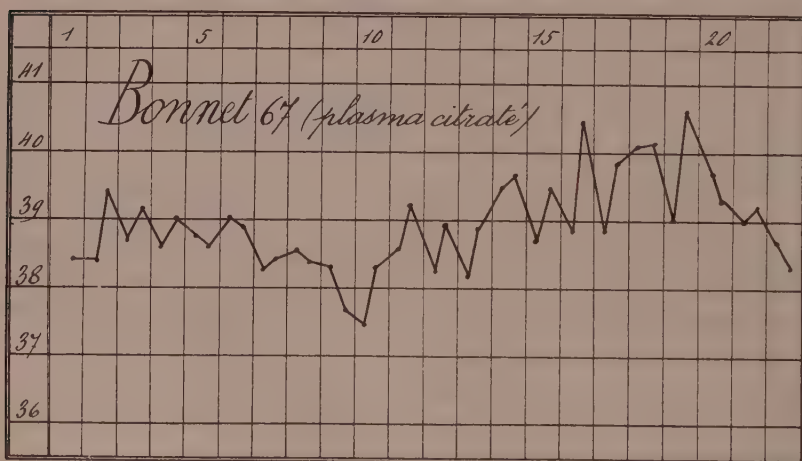
Bonnet 84 (globules blancs). Incubation 6 jours, typhus grave de 9 jours. La température dépasse 40 degrés pendant ces 9 jours (Courbe 15).



Exp. II. — Pratiquée dans les mêmes conditions que la précédente, avec le sang du malade 69, pavillon Emile-Roux, hôpital de la Rabta, au 13^e jour d'un typhus grave, la veille de la défervescence. La séparation des divers éléments du sang a demandé 30 minutes et a été plus parfaite que dans la première expérience; la couche leucocytaire, en particulier, était manifestement plus abondante et ne contenait qu'une proportion minime de globules rouges.

Trois singes ont été inoculés dans la cavité péritonéale, savoir : le *bonnet* 67, avec 5 cent. cubes de plasma citraté; le *bonnet* 68, avec 3 cent. cubes de globules rouges, centrifugés et lavés; le *bonnet* 79, avec 1 millim. cube de globules blancs représentant approximativement le dépôt leucocytaire obtenu par centrifugation de 10 cent. cubes de sang. Il n'a pas été pratiqué d'inoculation de sang complet, citraté ou frais. Les résultats de cette expérience ont été les suivants :

Bonnet 67 (plasma citraté). Incubation 13 jours, typhus léger de 7 jours. La température n'atteint 40 degrés que trois jours (Courbe 16).



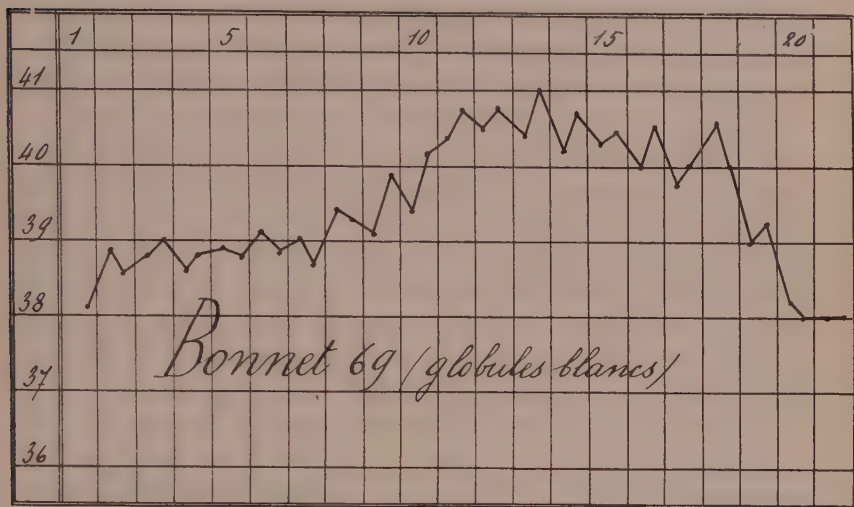
Courbe 16.

Bonnet 68 (globules rouges). Néant.

Bonnet 69 (globules blancs). Incubation 7 jours, typhus grave de 11 jours. La température dépasse 40 degrés pendant 9 jours (Courbe 17).

Eprouvés, 67 jours après la première inoculation, par l'injection intrapéritonéale de 5 cent. cubes de sang du bonnet 88, atteint d'un typhus grave au

5^e jour de la fièvre, les bonnets 67 et 69 n'ont pas réagi, le 68 (globules rouges) a présenté un typhus grave après 11 jours d'incubation (Voir plus loin leurs courbes au Chapitre : Immunité).



COURBE 17.

CONCLUSIONS. — Des deux séries d'expériences que nous venons de rapporter, il est permis de conclure que les globules blancs représentent dans le sang l'élément le plus virulent, puisqu'une dose infinitésimale de la couche leucocytaire obtenue par centrifugation se montre aussi efficace que la quantité totale du liquide de laquelle elle a été séparée.

Le plasma, moins actif, semble ne devoir sa virulence qu'aux globules blancs et débris leucocytaires, dont il est bien difficile de le séparer entièrement.

Les globules rouges sont dénués de tout pouvoir pathogène. Une dose de ces cellules 2.500 fois supérieure à celle qui est nécessaire pour obtenir l'infection, lorsqu'il s'agit de globules blancs, s'est montrée entièrement inactive.

Pour apprécier exactement ces résultats, il convient cependant de noter que les prélèvements de sang n'ont pas été pratiqués à la même période de la maladie humaine dans nos deux expériences : 7^e jour, pour le premier cas ; 13^e jour, pour le second, et que la quantité de globules blancs obtenue par centrifugation a été incomparablement plus importante chez le

deuxième malade que chez le premier. La plus parfaite localisation du virus dans les globules blancs et la moindre activité du plasma dans le second cas peuvent être en rapport, au moins partiellement, avec une réaction de défense de l'organisme (englobement du virus par les leucocytes), et, de fait, chez ce malade, la défervescence s'est produite le lendemain de l'expérience.

Il semble cependant acquis que, dès la période d'état, le siège principal, sinon unique, de l'agent inconnu du typhus est le globule blanc. Cette opinion, à laquelle les expériences que nous venons de relater apportent un si grand poids, s'accorde avec l'existence constatée par l'un de nous de lésions dégénératives des leucocytes polynucléaires dans le typhus. La localisation du microbe dans ces cellules donnerait la seule explication plausible des résultats presque toujours négatifs de la filtration du sérum. On comprendrait ainsi qu'un microbe invisible et dont les faibles dimensions devraient par là même permettre le passage à travers les bougies Berkefeld, retenu dans des cellules de dimensions plus grandes que les pores du filtre, ne puisse traverser ceux-ci. C'est là, nous l'avons dit, notre opinion. Les expériences qui suivent viennent encore l'appuyer.

B. — NON VIRULENCE DU SÉRUM SANGUIN

DÉBARRASSÉ DE SES ÉLÉMENTS CELLULAIRES PAR CENTRIFUGATION.

Le sérum sanguin de coagulation est, théoriquement du moins, dépourvu de cellules, celles-ci demeurant emprisonnées dans le caillot au moment de sa rétraction; il doit donc être, dans le typhus, si notre hypothèse du siège intralencocytaire du microbe est exacte, dépourvu généralement de virulence et, de fait, dans nos expériences de l'an passé, sur trois singes inoculés avec des doses suffisantes de sérum provenant de singes ou homme infectés, un seul a contracté la maladie; chez les deux autres, on n'a constaté ni infection, ni immunité (Cf. notre mémoire de 1910 de ces *Annales*, p. 402). L'expérience qui a donné un résultat positif était un passage de bonnet chinois à bonnet chinois; celles qui sont demeurées négatives avaient

été pratiquées sur le bonnet chinois avec un sang humain dans un cas et de chimpanzé dans l'autre.

On se souvient que, par contre, le sérum obtenu par centrifugation de sang défibriné a donné, dans les deux expériences de Ricketts et Wilder, des résultats positifs (infection et immunité des singes inoculés).

Nous avons fourni, dans notre mémoire antérieur, une explication de ces faits; elle est des plus claires, si l'on admet le siège intraleucocytaire du virus. Les manœuvres de défibrination, en déchirant les globules blancs, amènent la sortie d'un grand nombre de microbes; ceux-ci, mis en liberté dans le liquide, lui communiquent un pouvoir pathogène dont le sérum de coagulation est généralement dépourvu. Ce sérum ne doit présenter en effet de virulence que s'il n'est qu'incomplètement privé de globules blancs, et c'est là ce qui était arrivé sans doute dans notre expérience positive de l'an passé.

On pouvait nous objecter cependant que la non réussite habituelle de ces inoculations était due à ce que le singe n'offre à l'infection exanthématique qu'une sensibilité en somme relative (il faut pour infecter à coup sûr un bonnet chinois 3 à 4 cent. cubes de sang et la voie péritonéale), suffisante pour une étude expérimentale, mais non comparable à celle de l'être normalement atteint, l'homme.

Désirant trancher de façon définitive la question et persuadés d'avance que nous obtiendrions un résultat négatif, nous n'avons pas hésité à expérimenter sur l'un de nous (N.).

Le sérum utilisé dans cette expérience nous a été fourni par le bonnet 80, inoculé dans la cavité péritonéale, le 21 avril, avec 7 cent. cubes de sang du malade 88, hôpital de la Rabta, pavillon Murchison, au 10^e jour d'un typhus grave.

Cette inoculation a été suivie, après 6 jours d'incubation, du développement d'une infection très sérieuse, d'une durée de 13 jours, puis d'hypothermie et d'amaigrissement notable (Courbe 18).

Au 3^e jour, nous prélevons sur ce singe, par ponction cardiaque, quelques centimètres cubes de sang que nous plaçons dans une pièce fraîche et, sept heures plus tard, lorsque le sérum est bien séparé du caillot, nous prélevons ce liquide et nous le centrifugeons pendant 10 minutes; après quoi, un centimètre cube en est injecté dans la veine du bras de l'un de nous, indemne de toute atteinte antérieure de typhus. Aucun symptôme fébrile ou autre n'a suivi cette inoculation.



COURBE 18.

Le résultat négatif de cette expérience ne peut être attribué à des propriétés bactéricides dont jouirait *in vitro* le sérum sanguin sur l'agent pathogène du typhus; l'observation du bonnet 35 de notre mémoire de l'an passé démontre qu'il n'en est rien. Ce singe, en effet, a pu être infecté par l'inoculation intrapéritonéale de 15 cent. cubes du sérum du bonnet 49, neuf heures après la récolte du sang (Cf. notre mémoire précédent, p. 108).

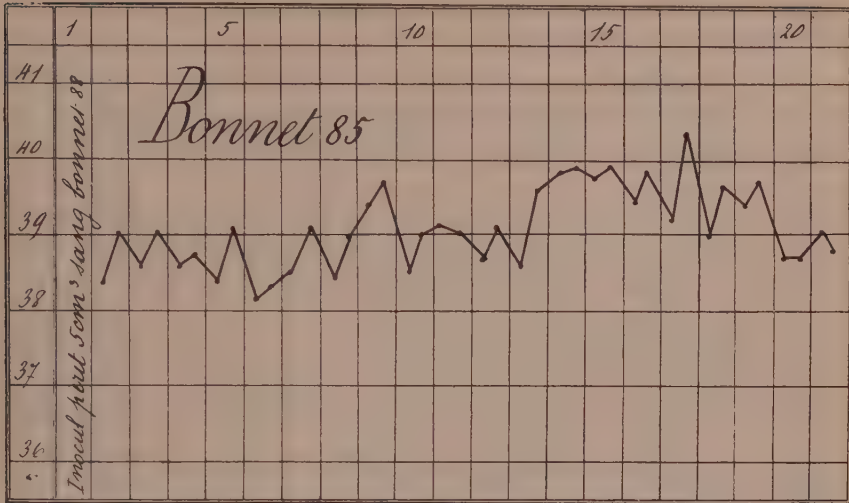
Le sérum sanguin de coagulation est donc, en l'absence de toute cellule, entièrement dépourvu de pouvoir pathogène.

C. — NON VIRULENCE DU LIQUIDE CÉPHALORACHIDIEN.

Ce liquide, qui ne contient aucun élément cellulaire, offre une virulence nulle; l'expérience suivante le démontre :

Le bonnet chinois 85 reçoit, le 23 avril, dans la cavité péritonéale, 15 cent. cubes du liquide céphalorachidien du malade 93, hôpital de la Rabta, pavillon Emile-Roux, au 9^e jour d'un typhus exanthématique grave. *Résultat négatif* (la température a été prise pendant 40 jours).

Epruvé 44 jours plus tard, par l'inoculation intrapéritonéale de 5 cent. cubes de sang du bonnet 88, au 9^e jour d'un typhus expérimental classique, le bonnet 85 a fait une infection des plus nettes, d'une semaine de durée, après une incubation de 12 jours (Courbe 19).



COURBE 19.

D. — EXPÉRIENCE NÉGATIVE DE FILTRATION DU VIRUS EXANTHÉMATIQUE AVEC DES PRODUITS LEUCOCYTAIRES.

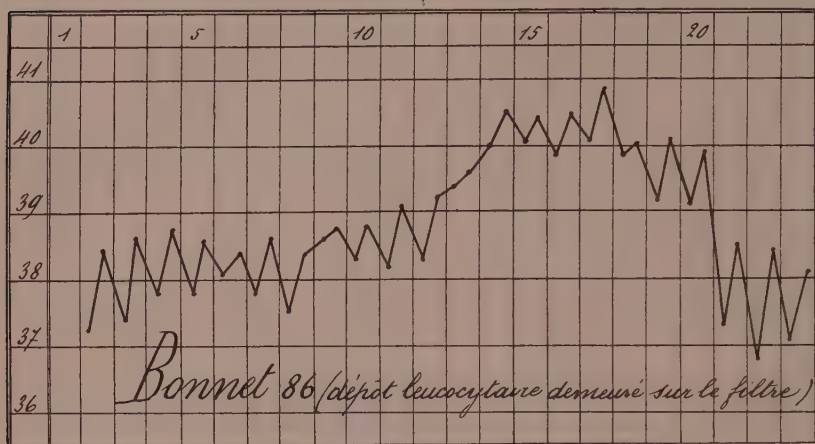
Les leucocytes se montrant hautement virulents, nous espérons qu'il serait peut-être possible d'obtenir, par la désagrégation artificielle d'une quantité importante de ces cellules, assez de microbes libres pour que leur émulsion filtrée infecte ou immunise le singe. Il n'en a rien été; dans ce cas encore, le nombre des microbes qui ont traversé le filtre était sans doute insuffisant.

La couche leucocytaire, obtenue par centrifugation de 70 cent. cubes de sang citraté du malade 120, au 7^e jour d'un typhus grave (Voir l'expérience I de centrifugation citée plus haut), a été soumise successivement à un broyage, puis à un laquage par l'eau distillée d'une durée de vingt minutes, enfin additionnée d'eau physiologique, et filtrée sur bougie Berkefeld du modèle le plus perméable. Ces diverses opérations ont demandé une heure et demie environ.

Le *bonnet chinois* 86 a reçu dans la cavité péritonéale la meilleure partie du dépôt demeuré sur le filtre; le 87 de la même manière, la totalité du produit filtré. Les résultats ont été les suivants :

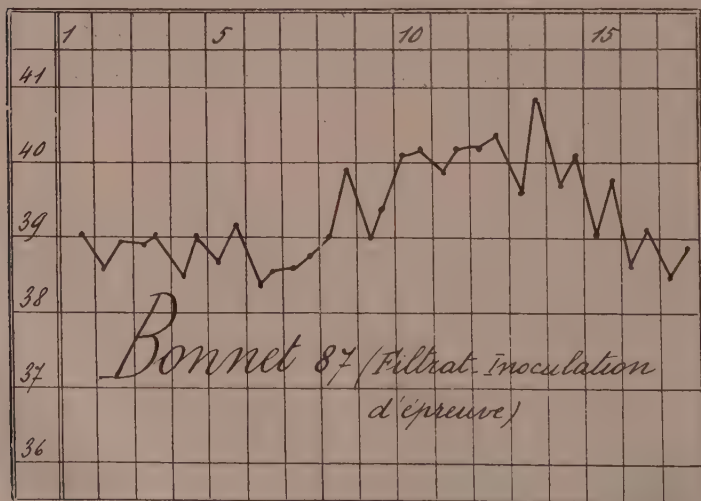
Bonnet 86 (dépôt demeuré sur le filtre). *Incubation 10 jours, typhus classique de 10 jours*, suivi d'hypothermie (Courbe 20). Ce résultat est à ajouter à ceux des expériences I et II; il contribue à établir la haute virulence des leuco-

cytes et il prouve la résistance du virus au traitement par l'eau distillée et à des manipulations assez longues.



COURBE 20.

Bonnet 87 (filtrat). Résultat négatif (température prise pendant 40 jours) Eprouvé, 48 jours après l'inoculation, par l'injection intrapéritonéale de 5 cent. cubes de sang du malade 162, hôpital de la Rabta, pavillon Laveran, au 9^e jour d'un typhus mortel, ce singe a contracté un typhus de 8 jours de durée, après une incubation de 7 jours (Courbe 21).



COURBE 21

L'extrait leucocytaire filtré s'est donc montré dépourvu de propriétés pathogènes ou vaccinales.

L'expérience positive de filtration du virus exanthématique relatée dans notre précédent mémoire demeure par conséquent unique.

Que les globules blancs du sang constituent ou non le siège exclusif du virus exanthématique, la propriété qu'ils offrent de présenter, sous un volume restreint et facilement maniable, un produit hautement virulent est intéressante à signaler. Elle trouvera utilement son application dans les expériences où l'emploi de doses fortes et par là même toxiques de sang complet semblaient jusqu'à présent nécessaires.

III

EXPÉRIENCES CONCERNANT L'IMMUNITÉ

par CHARLES NICOLLE et E. CONSEIL.

Nos expériences de l'an passé nous avaient conduits à cette conclusion qu'une première atteinte de typhus expérimental donnait au singe une immunité solide toutes les fois que la maladie avait été grave et quel que fût le mode d'infection (sang, poux), et qu'au contraire une atteinte légère et abortive (par sang virulent employé à doses trop faibles ou par voie cutanée, sérum sanguin ou sang chauffé) n'était généralement pas suivie d'immunisation; ce qui revenait à dire que, seule, une atteinte sévère de typhus préservait à coup sûr contre une infection nouvelle.

Nos recherches de 1911 nous ont permis de confirmer exactement cette conclusion; les expériences très diverses que nous allons brièvement rapporter en sont la preuve; elles s'accordent également à démontrer que *l'immunité par virus actif s'établit vite et qu'elle dure au moins une année.*

A. — UNE INOCULATION DE VIRUS ACTIF DONNE UNE IMMUNITÉ RAPIDE ET DURABLE.

1^o IMMUNISATION PAR INOCULATION DE SANG COMPLET.

Bonnet 42. 1^{re} inoculation (1), le 14 août 1910, de 4 cent. cubes 1/2 de sang du bonnet 20, au 7^e jour d'un typhus grave, la veille de la défervescence. Incubation 12 jours, typhus grave de 11 jours, hypothermie, amaigrissement, guérison (Voir dans notre mémoire précédent, p. 25, l'observation et la courbe thermique de ce singe).

Inoculation d'épreuve, le 17 mars 1911, avec 5 cent. cubes de sang du malade 51, hôpital de la Rabta, pavillon Emile-Roux, au 11^e jour d'un typhus grave. *Résultat négatif* (température prise pendant 40 jours). Trois témoins neufs, le *bonnet 64* et les *cobayes 50* et *51*, ont présenté un typhus grave (voir plus haut chapitre I de ce mémoire).

Bonnet 64. 1^{re} inoculation, le 17 mars 1911, avec 4 cent. cubes de sang du malade 51. Incubation 6 jours, typhus classique d'une durée de 10 jours.

Inoculation d'épreuve, le 7 avril, soit 5 jours après guérison de la première infection, avec 5 cent. cubes de sang du bonnet 70, au 4^e jour de sa maladie. *Résultat négatif* (température prise pendant 40 jours). Témoins, le *bonnet 71* et les *cobayes 72* et *75*, qui ont contracté le typhus (voir plus haut, chapitre I de ce mémoire).

Bonnet 71. 1^{re} inoculation, le 7 avril 1911, avec 5 cent. cubes de sang du bonnet 70, au 4^e jour de son infection. Incubation 8 jours, typhus grave de 12 jours de durée.

Inoculation d'épreuve, le 21 mai, soit 24 jours après guérison de la première infection, avec 5 cent. cubes de sang du malade 120, hôpital de la Rabta, pavillon Murchison, au 6^e jour de sa maladie. *Résultat négatif* (température prise pendant 40 jours). Témoins, les *bonnets 81*, *82*, *84* qui ont contracté le typhus (voir plus haut, chapitre II, première expérience).

2^o IMMUNISATION PAR INOCULATION DE PLASMA VIRULENT.

Bonnet 67. 1^{re} inoculation, le 29 mars 1911, avec 5 cent. cubes de plasma citraté du malade 69, hôpital de la Rabta, pavillon Emile-Roux, au 13^e jour de sa maladie. Incubation 13 jours, typhus relativement bénin de 7 jours (voir plus haut, courbe 16).

Inoculation d'épreuve, le 6 juin, soit 48 jours après guérison de la première atteinte, avec 5 cent. cubes de sang du bonnet 88, au 9^e jour de son infection. *Résultat négatif* (température prise pendant 40 jours). Témoins, les *bonnets 66*, *77* et *85*, qui ont contracté le typhus (voir plus bas dans ce même chapitre leurs observations et leurs courbes).

(1) Les inoculations virulentes et les inoculations d'épreuve ont toujours été pratiquées dans la cavité péritonéale.

B. — UNE INOCULATION INEFFECTIVE OU INSUFFISAMMENT ACTIVE NE DONNE PAS D'IMMUNITÉ.

1^o NON IMMUNISATION A LA SUITE D'UNE INFECTION ABORTIVE PAR INOCULATION DE SANG.

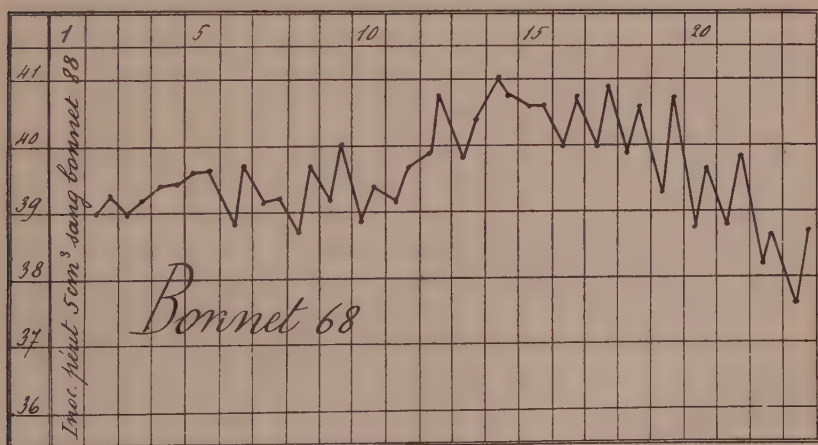
Bonnet 77. 1^{re} inoculation, le 20 avril 1914, avec 4 cent. cubes de sang du cobaye 75, au 14^e jour après sa propre inoculation, en dehors de toute réaction thermique (Cf., chapitre 1, l'observation particulièrement intéressante de ce cobaye.) Incubation 7 jours, typhus abortif de 2 jours de durée.

Inoculation d'épreuve, le 6 juin, soit 38 jours après guérison de la première atteinte, avec 5 cent. cubes de sang du bonnet 88, au 9^e jour de son infection. Incubation 11 jours, typhus de gravité moyenne de 11 jours de durée. Les témoins, bonnets 68 et 85, ayant reçu antérieurement des produits non virulents (globules rouges et liquide céphalorachidien), ont pris le typhus après une incubation d'une durée identique (voir plus bas).

2^o NON IMMUNISATION PAR INOCULATION INEFFECTIVE DE GLOBULES ROUGES.

Bonnet 68. 1^{re} inoculation, le 29 mars 1914, avec 2 cent. cubes 1/2 des globules rouges centrifugés et lavés du malade 69 (voir chapitre précédent, deuxième expérience), résultat négatif (température prise pendant 40 jours).

Inoculation d'épreuve, le 6 juin, soit 79 jours après la première inoculation, avec 5 cent. cubes de sang du bonnet 88, au 9^e jour de son infection. Incubation 11 jours, typhus grave de 8 jours (courbe 22). Le virus du bonnet 68 a infecté les cobayes 52 et 53, et, par l'intermédiaire du premier, le bonnet 89.



COURBE 22.

3^o NON IMMUNISATION PAR INOCULATION INEFFECTIVE DE LIQUIDE CÉPHALORACHIDIEN.

Bonnet 85. 1^{re} inoculation, le 23 avril 1914, avec 15 cent. cubes de liquide céphalorachidien du malade 93, au 9^e jour d'un typhus grave (voir chapitre précédent). Résultat négatif (température prise pendant 40 jours).

Inoculation d'épreuve, le 6 juin, avec 5 cent. cubes de sang du bonnet 88. au 9^e jour d'un typhus grave. *Incubation 12 jours, typhus d'une durée de 7 jours* (voir plus haut, courbe 19).

C. — EFFETS DES INOCULATIONS SIMULTANÉES OU SUCCESSIVES DE SANG VIRULENT ET DE SÉRUM PRÉVENTIF (*Sérovaccination*).

Il nous a paru intéressant de rechercher comment se comporteraient, vis-à-vis d'une inoculation d'épreuve, les animaux soumis antérieurement et à la fois à des inoculations de sang virulent et de sérum de malades convalescents de typhus, soit que ce sérum ait été employé préventivement, c'est-à-dire avant l'inoculation du virus, soit qu'il en ait été fait usage plus tard, pour le traitement de l'infection expérimentale déclarée.

Nos expériences de l'an passé nous avaient montré qu'un tel sérum, s'il est doué de propriétés préventives manifestes lorsqu'on le recueille dans les premiers jours qui suivent la chute de la température, n'offre plus qu'un pouvoir vaccinant incertain quand il est recueilli plus tard et que, dans tous les cas, ses propriétés curatives sont des plus faibles (L'application de ce sérum au traitement de l'homme malade ne donne aucun bénéfice appréciable. Des expériences nouvelles nous l'ont prouvé; nous les rapportons plus loin).

Sur ceux de nos singes qui survivaient de nos expériences de l'an passé, nous en comptons quatre ayant reçu des injections de sérum de convalescents, deux au cours de leur infection déclarée, et deux préventivement. Des deux derniers, l'un avait été protégé effectivement par un sérum recueilli dans les premiers jours de la convalescence et suffisamment actif, l'autre n'avait tiré d'autre bénéfice de l'injection d'un sérum plus ancien qu'un léger allongement de la période d'incubation de son typhus.

Ces singes, soumis en 1911 à une inoculation d'épreuve, ont fourni les résultats auxquels on pouvait s'attendre : les trois qui avaient présenté une infection nette en 1910 n'ont pas réagi; celui que le sérum avait alors protégé a montré, sauf une durée plus longue de la période d'incubation (16 jours au lieu de 6, 8 et 10), la même sensibilité que les témoins neufs.

La loi que nous avons formulée au début de ce chapitre trouve, dans ces résultats, une nouvelle confirmation; seule, une atteinte sévère de typhus préserve à coup sûr contre une infection nouvelle.

Voici les observations de nos quatre singes.

1° SINGES AYANT PRÉSENTÉ ANTÉRIEUREMENT UN TYPHUS EXPÉRIMENTAL TRAITÉ PAR LE SÉRUM.

Ils avaient acquis l'immunité.

Bonnet 56. — Ce singe, inoculé le 5 juillet 1910, dans la cavité péritonéale (Cf. notre précédent mémoire, courbe 47, p. 52), avec 5 cent. cubes de sang du bonnet 44, a présenté, après 7 jours d'incubation, un typhus grave. Il était en pleine infection, lorsqu'il a reçu, les 9^e et 10^e jours de sa fièvre, en injections sous-cutanées, 2 inoculations de 2 cent. cubes d'un mélange du sérum des malades 50 et 51 recueilli les 11^e et 9^e jours après la guérison de leur typhus. Ce mélange était doué de propriétés préventives manifestes (voir plus bas l'observation du bonnet 57). Sous l'influence de ce traitement, la température du bonnet 56 est tombée en 48 heures à la normale et l'état général s'est vite amélioré. Cependant, malgré cette action bienfaisante, la fièvre a eu, au total, une durée de 12 jours.

L'inoculation d'épreuve, pratiquée le 18 juin 1911, avec 4 c. c. 1/2 de sang du malade 146, hôpital de la Rabta (pavillon Murchison), atteint d'un typhus grave à une période imprécise de son infection, la veille de la mort, a donné un *résultat négatif* (température prise pendant 40 jours).

Bonnet 62. — Ce singe, inoculé le 10 août 1910 dans la cavité péritonéale, avec 5 cent. cubes de sang du magot 7, au 6^e jour d'un typhus sévère, s'infecte, après 7 jours d'incubation. Il présente un typhus grave, lorsque, le 5^e jour de sa fièvre, on lui inocule sous la peau 2 cent. cubes d'un mélange du sérum des malades 37, 54 et 56, guéris depuis 14, 20 et 27 jours; ce mélange s'était montré doué de propriétés préventives très faibles. Son inoculation au bonnet 62 amène une baisse immédiate de la température qui remonte après 24 heures; on lui fait alors une deuxième inoculation du même sérum à même dose, nouvelle baisse de 24 heures, puis réascension et la fièvre dure encore 4 jours. L'influence du sérum, dans ce cas, a été manifeste et la guérison s'est faite sans hypothermie, mais après une durée totale de 13 jours (Cf. dans notre mémoire précédent l'observation et la courbe de ce singe, p. 53).

L'inoculation d'épreuve, pratiquée le 18 juin 1911, avec 4 c. c. 1/2 de sang du malade 146, a donné un *résultat négatif* (température prise pendant 40 jours).

2° SINGE TRAITÉ INEFFICACEMENT PAR UNE INJECTION PRÉVENTIVE D'UN SÉRUM INSUFFISAMMENT ACTIF.

Il avait acquis l'immunité.

Bonnet 61. — Ce singe, inoculé le 10 août 1910, dans la cavité péritonéale, avec 5 cent. cubes de sang du magot 7, au 6^e jour d'un typhus grave et en

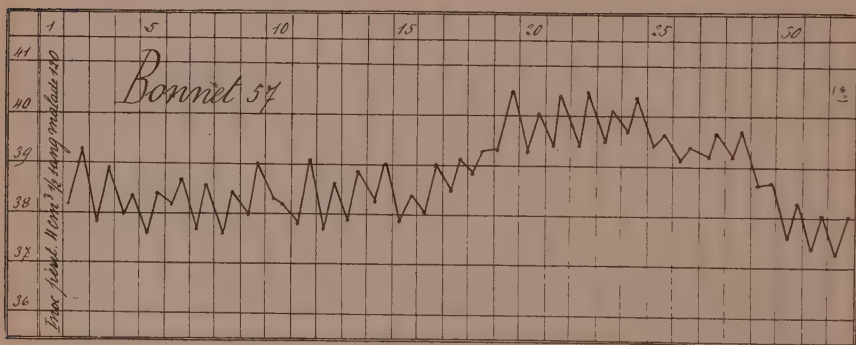
même temps sous la peau avec une quantité égale d'un mélange de sérum des malades 37, 54 et 56, guéris depuis 14, 20 et 27 jours, a contracté quand même un typhus grave d'une durée de 7 jours, après 5 jours d'incubation (Cf. l'observation et la courbe de ce singe dans notre mémoire précédent, page 50).

L'inoculation d'épreuve pratiquée le 24 mars 1911, avec le sang du malade 62, hôpital de la Rabta, pavillon Emile-Roux, au 15^e jour de sa maladie, a donné un *résultat négatif* (température prise pendant 40 jours). Témoin le bonnet 65 qui s'est infecté.

3^o SINGE PROTÉGÉ EFFICACEMENT PAR UNE INJECTION DE SÉRUM PRÉVENTIF.

Il n'avait pas acquis l'immunité.

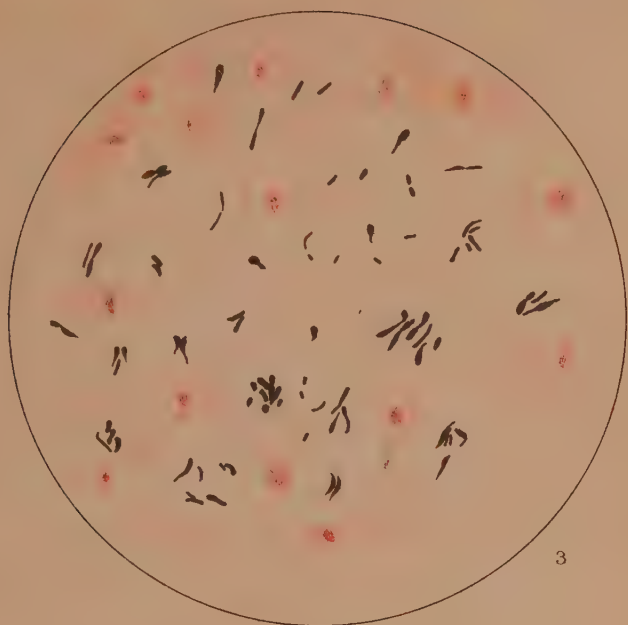
Bonnet 57. — Ce singe avait reçu, le 14 juillet 1910 à midi, une inoculation sous-cutanée de 4 c.c. 1/2 de mélange du sérum des malades 50 et 51, aux 11^e et 9^e jours de la convalescence de leur typhus, et, le même jour, à 6 heures du soir, dans la cavité péritonéale, 4 cent. cubes de sang du malade 37, atteint d'un typhus grave au 10-12^e jour; témoins : le bonnet 20 et le magot 5, qui se sont infectés. Le bonnet 57 n'avait présenté aucune réaction (température prise pendant 40 jours).



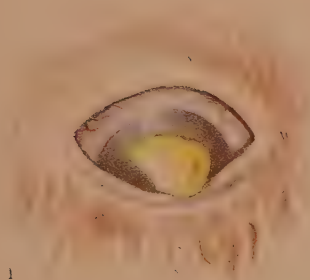
COURBE 23.

L'inoculation d'épreuve a été pratiquée le 21 mai 1911, avec 4 centimètres de sang du malade 120, utilisé dans plusieurs expériences relatées plus haut. Le bonnet 37 a contracté un *typhus grave* de 12 jours de durée, suivi d'hypothermie, après 16 *jours d'incubation* (courbe 23). Cette longueur anormale de l'incubation est le seul bénéfice que ce singe semble avoir tiré de l'inoculation inefficace de sang virulent, pratiquée dix mois auparavant.

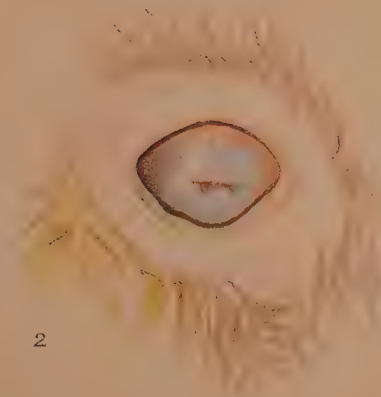
(A suivre.)



3



1



2



4

LE « MAL DE LURE »

PYOHÉMIE SECONDAIRE A L'AGALAXIE CONTAGIEUSE DE LA BREBIS ET DE LA CHÈVRE

(avec la pl. IV)

par H. CARRE

Chef du Laboratoire des recherches sur les Maladies infectieuses
(École d'Alfort).

Au cours des recherches systématiques que je poursuis depuis plusieurs années sur la suppuration chez le mouton, j'avais isolé, en novembre 1910, dans le pus d'une mammite phlegmoneuse de la brebis, mammite cliniquement semblable à celle due au microbe de la suppuration caséuse (*V. Revue générale de Médecine Vétérinaire*, 1^{er} décembre 1910), un petit bacille très délicat existant en abondance dans les lésions.

La brebis provenait d'un lot de bêtes en très mauvais état, achetées au marché de la Villette et d'origine inconnue.

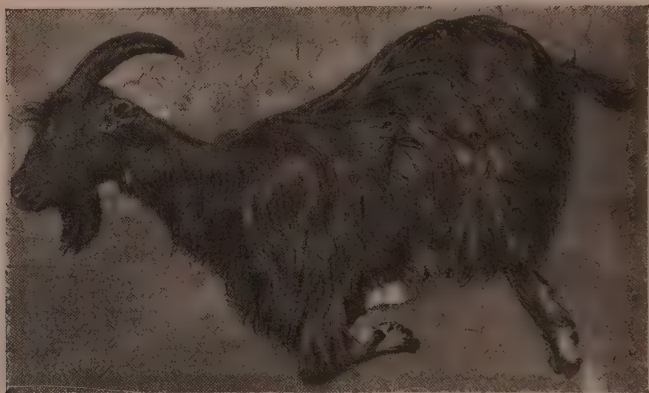
J'avais conservé les cultures de ce bacille, mais, ne lui accordant qu'un intérêt relatif, j'en avais ajourné l'étude approfondie, quand de récentes constatations m'ont fait voir qu'il pouvait revendiquer une place assez importante dans la pathologie ovine et caprine.

En janvier 1911, M. le vétérinaire en 1^{er} Lardeyret m'écrivait : « Une maladie épidémique extrêmement grave a sévi sur un grand nombre de troupeaux au pâturage, cet été, dans la montagne de Lure (confins de la Drôme et des Basses-Alpes).

La maladie se manifestait par la fonte purulente des yeux et par la présence d'arthrites suppurées des genoux, des grassets et des hanches, avec étiisie musculaire progressive suivie d'épuisement organique.

Elle atteignait plus spécialement les antenais, mais les brebis de quatre à cinq ans n'en étaient pas exemptes. Bien que la mortalité ne fût pas très élevée, les pertes étaient néanmoins considérables pour les éleveurs, car les animaux atteints restaient aveugles, émaciés, boiteux et peu susceptibles d'engraissement après guérison.

Les lésions consistaient en étiisie complète, sans lésions viscérales apparentes, sauf toutefois de légers foyers de broncho-pneumonie : fonte purulente du globe oculaire avec sanie intra-orbitaire, abcès articulaires avec pus verdâtre, ramollissement



N° 511. — Maladie naturelle.

des ligaments articulaires qui prenaient un aspect gélatini-forme, lésions d'arthrites suppurées.

C'est la première fois qu'une pareille infection est observée dans le pays et l'ennui des éleveurs est d'autant plus grand que les pertes par maladies contagieuses sont, chaque année, de plus en plus nombreuses. »



N° 435. — Maladie expérimentale.

Avec ces renseignements précis, M. Lardeyret me faisait expédier par M. Jeofroy, de Forcalquier, deux sujets atteints de la maladie; je suis très heureux de renouveler ici, à ces

messieurs, mes plus vifs remerciements.

Des deux moutons envoyés de Forcalquier, dans un état de maigreur extrême, un seul présentait des lésions oculaires (n° 420).

L'examen clinique et celui des lésions révélées par l'autopsie répondaient intégralement à la description faite par M. Lardeyret.

L'examen microscopique du pus de la chambre antérieure du mouton 420 fit voir, en abondance, un bacille très grêle, prenant le Gram, refusant de pousser sur les milieux simples, bacille que j'identifiai facilement avec celui que j'avais isolé en novembre 1910 d'une mammite phlegmoneuse.

L'inoculation de ce microbe au mouton me fournit des résultats tels qu'une étude de la maladie sur place me parut indiquée.

M. Arlaud, vétérinaire départemental des Basses-Alpes, et M. Jeoffroy, de Forcalquier, se mirent avec le plus grand empressement à ma disposition pour me faire visiter les centres infectés, environs d'Oraison et montagne de Lure, tandis que mon excellent ami Pleindoux, vétérinaire départemental de la Vaucluse, m'accompagnait à l'autre extrémité de cette région montagnaise, vers Orange, dans les contreforts ouest du mont Ventoux.

Grâce à ces concours empressés, j'ai pu voir nombre de cas cliniques et retrouver, notamment, en plus des lésions oculaires et articulaires, les lésions de la mamelle.

Tandis qu'à l'est, vers Forcalquier et Oraison, la mortalité était en somme exceptionnelle, à l'ouest, au contraire (Gigondas), nous avons rencontré en pleine montagne un troupeau déjà visité antérieurement à mon arrivée par M. Pleindoux et dont il a bien voulu nous communiquer l'histoire.

Je la transcris intégralement ici car elle donne une excellente idée de l'allure de l'affection sous la forme la plus sévère.

Ce troupeau, appartenant à M. F..., de Gigondas, quartier du Queyron (Vaucluse), était composé de 60 brebis laitières ou agneaux et de 20 chèvres.

Vers le commencement de janvier, une affection caractérisée par de petits abcès sur toutes les parties du corps, par des localisations inflammatoires de la mamelle, de l'œil et des articulations fait rapidement de nombreuses victimes.

Indistinctement, les brebis, les agneaux et les chèvres étaient frappés.

Le troupeau avait reçu des animaux nouvellement achetés

au mois de novembre et provenant d'une exploitation qui est restée indemne de toute maladie.

Il a été permis de constater trois formes : l'une suraiguë, l'autre aiguë, la troisième chronique.

Forme suraiguë. — L'animal manifeste brusquement une grande faiblesse, ne mange plus, suit difficilement le troupeau et tombe paralysé du train postérieur, quelquefois des quatre membres.

La fièvre est intense, 41°5 à 42 degrés. On n'observe dans cette forme aucune localisation : l'animal meurt en deux ou trois jours, 12 brebis et 4 chèvres ont ainsi succombé.

Forme aiguë. — Moins rapide que la précédente : on constate chez la brebis et chez la chèvre des lésions de la mamelle, qui devient chaude et très douloureuse.

La sécrétion lactée est très diminuée : le lait est blanc sale, grumeleux. Des abcès se forment et s'ouvrent à maturité : il n'est pas rare de voir une mamelle avec deux ou trois abcès en voie d'évolution et un ou deux abcès ouverts. La mamelle reste atrophiée, molle, avec des noyaux indurés : elle est perdue pour la lactation.

Les accidents articulaires se manifestent principalement aux genoux et aux jarrets. Ils s'annoncent par une boiterie très grave : on observe ensuite des lésions d'arthrite et de périarthrite. Les animaux restent couchés, immobiles, car tout déplacement est douloureux.

Les abcès péri-articulaires s'ouvrent et la suppuration est très longue à se tarir. Enfin on peut observer de l'ankylose. Dans ces cas l'articulation ne s'ouvre pas, elle reste engorgée, les gaines sont distendues.

La localisation oculaire est très fréquente : elle commence par de l'opacité de la cornée qui augmente peu à peu et devient complète.

La conjonctive se tuméfie, le pourtour de l'œil devient rouge, la cornée s'ulcère et on constate du pus dans la chambre antérieure. A ce moment, l'œil est volumineux, l'irritation causée par l'écoulement du pus sur la face donne à la tête un aspect hideux.

Quelquefois ces lésions, lorsqu'elles ne sont pas graves s'amendent, cette forme évolue en vingt à trente jours ; elle est mortelle dans 80 p. 100 des cas.

Tous les agneaux dont les mères étaient malades ont rapidement succombé à la faim et à la maladie.

Forme chronique. — Les 16 animaux qui ont résisté, 3 chèvres, 9 brebis et 4 agneaux, ont vu les accidents s'atténuer et ont pris la forme chronique.

Les malades se remettent lentement et très difficilement : les chèvres et les brebis ne pourront plus fournir de lait. Dans 90 p. 100 des cas on a constaté des lésions oculaires et des mamelles ; dans 50 p. 100, des lésions articulaires existaient.

En résumé : sur 80 bêtes, on ne compte que 16 survivants ; toutes ont été malades et 64 ont succombé.

Les observations de M. Arlaud, consignées dans son rapport annuel, concordent avec celles faites par M. Pleindoux ; cependant, et pour des raisons insoupçonnées, la maladie a été beaucoup moins sévère dans les Basses-Alpes qu'en Vaucluse.

M. Arlaud écrit en effet : « La mort est l'exception, mais les cas de guérison sont rares ; la plupart des sujets atteints maigrissent considérablement et continuent à s'entretenir péniblement dans cet état de maigreur, si bien que le propriétaire se décide à les abattre.

Le mal de Lure est une maladie infectieuse dont la contagion se fait lentement : c'est ainsi que dans un troupeau de 300 bêtes, où la maladie règne depuis six mois, il y a eu 50 malades. »

M. Arlaud signale, de plus, que le mal de Lure ne sévit pas sur les chèvres ; il ne semble pas avoir constaté la localisation mammaire.

On voit, par cet exposé, combien l'affection est variable, dans ses lésions et dans sa gravité.

NATURE DE LA MALADIE

Les localisations si particulières de la maladie, aux yeux, aux articulations et à la mamelle devaient logiquement faire penser à l'agalaxie contagieuse.

Cependant, de l'aveu même des auteurs qui ont tenté l'étude bactériologique de l'agalaxie, Hess et Guillebeau, Oreste et Marcone, Bournay et Leclainche, Celli et Blasi, aucun microbe ne s'est montré capable de reproduire la maladie.

Oreste et Marcone isolent bien du lait quatre espèces de cocci, mais ils n'osent accorder la spécificité à aucun d'eux. Bournay et Leclainche n'ont rien obtenu avec les produits recueillis purement au niveau des lésions chroniques de l'œil et des articulations; desensemencements sur différents milieux, à l'air et dans le vide, restèrent stériles presque toujours.

Enfin, les beaux travaux de Celli et de Blasi conduisent ces auteurs à la découverte d'un virus filtrant qui permet de reproduire l'agalaxie et ses différentes localisations.

Nos collègues italiens, qui ont eu à leur disposition un vaste champ d'observation, puisque l'agalaxie sévit chaque année sur plusieurs milliers de moutons des provinces centrales et méridionales de l'Italie, signalent la rareté des complications purulentes dans la mamelle et celle, encore plus grande, des suppurations de l'œil et des articulations.

Ils sont complètement muets au sujet des microorganismes qu'ils ont pu rencontrer dans ces rares lésions purulentes.

A coup sûr, si le microbe que nous avons étudié dans le mal de Lure était tombé sous les yeux des observateurs précités, leur attention eût été attirée sur lui.

Étant donné que, dans le mal de Lure, la suppuration était la règle, que, d'autre part, soit sur les animaux atteints de la maladie naturelle, soit sur les animaux d'expériences, je constatais des lésions non décrites dans l'agalaxie, j'étais prêt à regarder, avec nos confrères des Basses-Alpes, le mal de Lure comme une affection constituant une entité morbide spéciale et toute nouvelle.

Cependant, si l'expérimentation me permettait de reproduire les lésions purulentes du mal de Lure, elle me montrait aussi que le microbe isolé par moi était incapable d'amener l'état cachectique constaté dans la maladie naturelle. Des brebis, inoculées expérimentalement et présentant de volumineux abcès mammaires, continuaient, pendant de longs mois, à jouir d'un excellent état de santé général et finissaient pas se débarrasser de toutes leurs lésions.

Je tins à voir de près des animaux atteints d'agalaxie. M. Scoffié, vétérinaire départemental des Alpes-Maritimes, et M. Eyriès, vétérinaire à Carpentras, avec une obligeance dont je ne saurais trop les remercier, me firent envoyer plusieurs sujets.

Sur les 6 brebis de M. Eyriès, je pus isoler le microbe d'une seule mamelle, et une chèvre du lot de M. Scoffié, présentant des lésions oculaires et mammaires, me montra bien le bacille dans le pus de l'œil, mais le lait altéré de la mamelle ne le renfermait pas et cependant *ce lait et le filtrat de ce lait* infectèrent 3 moutons par la veine, et 2 brebis par la mamelle.

Il devenait évident que les lésions purulentes renfermant le bacille ne constituaient qu'une complication secondaire de l'agalaxie.

Le mal de Lure n'est donc qu'une infection qui vient se greffer sur l'agalaxie : son microbe est cependant spécifique, c'est un nouveau bacille pyogène doué d'une certaine virulence, auquel j'ai donné le nom de *pyobacille du mouton et de la chèvre*.

Sa présence augmente de beaucoup la gravité de l'infection primitive, ses caractères biologiques sont intéressants à plus d'un titre : pour ces raisons j'ai cru devoir en faire une étude un peu approfondie.

CLINIQUE

La description qui suit s'applique, il convient de le noter, à des animaux atteints à la fois d'agalaxie et de mal de Lure. Nous n'insisterons que sur les lésions dans lesquelles nous avons constaté la présence du pyobacille ou qui, malgré l'absence de cet agent pathogène, nous paraissent cependant sous sa dépendance. Nous éclaircirons ce point dans la suite.

N° 420 (Forcalquier). Vieille brebis très maigre : la station quadrupédale est impossible, l'animal marche sur ses genoux qui sont volumineux, aplatis, indurés et indolores.

Nous ferons observer de suite que cette position est fréquemment constatée sur les malades atteints de la maladie naturelle ou infectés artificiellement.

L'œil gauche, enfoncé dans l'orbite souillée par un pus jaunâtre, et caché par les paupières, est complètement atrophie : le pus s'écoule de la cavité orbitaire sur la joue et le chanfrein en se desséchant.

La chambre antérieure renferme quelques gouttes de pus liquide, jaune verdâtre, qui sort facilement par une fistule centrale de la cornée, située au fond d'un infundibulum.

La sérosité articulaire se montre stérile : le pus de l'œil, par contre, fait voir en abondance le pyobacille associé à un organisme cocciforme, ne prenant pas le Gram, {coccus que nous avons rencontré souvent dans la suite et qui s'est montré dépourvu de tout pouvoir pathogène.

N° 440 (Gigondas). Ophtalmie purulente de l'œil gauche, dont le pus est d'une richesse extrême en pyobacilles (fig. 1, Pl. IV).

N° 441 (Gigondas). Brebis de 2 ans, en assez bon état. Les mamelles sont augmentées de volume, bosselées. La palpation fait constater la présence de plusieurs noyaux profonds, fermes, grès comme des noix.

Ces noyaux renferment du pus vert pâle, crémeux : l'un d'eux s'est ouvert, laissant une petite poche suppurante. Le pus est très riche en pyobacilles.

N° 445. Brebis de 2 ans, en très mauvais état. Ophtalmie de l'œil droit. A travers la cornée sort et s'étale un tissu blanchâtre qu'il est impossible de détacher avec une pince : il s'arrache en lambeaux et paraît fixé au fond de l'œil.

L'extrémité libre du cartilage de l'oreille droite est nécrosée : la pression sur la peau, à ce niveau, fait sourdre quelques gouttes de pus verdâtre très riche en pyobacilles. (La nécrose de l'extrémité de l'oreille est fréquente sur les animaux atteints d'agalaxie et cependant je n'ai trouvé cette lésion signalée chez aucun auteur.) Le genou droit est le siège d'un engorgement chaud et douloureux, avec des points fluctuants ; l'animal boite d'une façon intense.

La ponction d'un des points fluctuants donne écoulement à du pus crémeux, verdâtre, *stérile à la culture*.

N° 409. Vieille brebis maigre d'origine inconnue. Mamelles bosselées par des noyaux indurés : une fistule, communiquant avec l'un d'eux, donne du pus liquide, verdâtre, très riche en pyobacilles.

N° 502. Vieille brebis en très mauvais état d'origine inconnue.

A l'autopsie, un des ganglions mésentériques a le volume d'un œuf de poule et renferme du pus verdâtre, crémeux, d'une extrême richesse en pyobacille, paraissant pur au microscope.

N° 510. Chèvre (Nice). L'œil droit porte une fistule centrale donnant par la pression du pus verdâtre très riche en pyobacilles (fig. 2, Pl. IV).

N° 529 (Carpentras). Brebis maigre. La mamelle droite renferme du pus verdâtre qui, ensemené en bouillon sérum, donne une culture mixte de pyobacille et de streptocoque.

Dans toutes les lésions renfermant le pyobacille, le pus s'est montré crémeux, homogène, sans odeur, vert pâle : le microbe y est facilement constaté car son abondance est extrême, en général.

Nous l'avons donc rencontré dans l'œil, dans la mamelle, dans un ganglion et sous la peau du cartilage auriculaire nécrosé, mais jamais dans le pus articulaire. Celui-ci s'est toujours montré stérile ; disons de suite qu'il en fut presque toujours de même chez les animaux infectés artificiellement.

BACTÉRIOLOGIE

Les produits pathologiques examinés furent récoltés sur des animaux provenant des Basses-Alpes, de la Vaucluse et des Alpes-Maritimes, ou achetés au marché de la Villette et provenant des régions infectées.

L'examen du pus extrait de la chambre antérieure (4 cas), de la mamelle (3 cas), d'un chancre de l'oreille (1 cas), d'un ganglion mésentérique (1 cas) nous a montré, toujours en abondance, le pyobacille, associé parfois à un fin coccus ne prenant pas le Gram, et paraissant dénué de toute virulence. Ce coccus, injecté sous la peau, dans un trayon, dans l'œil, dans la veine de moutons ou de brebis, a été incapable de créer une lésion quelconque.

Chose curieuse, le pus des lésions articulaires (4 cas) s'est toujours montré stérile : nous tenons à faire remarquer de nouveau que le pus articulaire des animaux infectés expérimentalement était également stérile le plus souvent. Mais si la dose injectée, dans la veine, est un peu forte, les abcès articulaires et péri-articulaires se montrent d'une richesse extrême en pyobacilles. Il y a là une question de dose, très probablement, le pouvoir bactériolytique du pus se trouvant débordé par un apport exagéré de germes virulents.

Quoi qu'il en soit, lorsque le pyobacille existe dans le pus, il s'y montre en général très abondant ; si dans les lésions ouvertes il est accompagné d'autres espèces microbiennes, sa forme permet de le distinguer aisément.

Avec un faible grossissement (1000-1200 D), il ressemble à s'y méprendre au bacille du rouget. C'est un bacille très grêle, en articles d'inégale longueur, très polymorphes, libres ou en petits amas enchevêtrés.

Un objectif puissant est indispensable pour mieux apprécier la grande variété de formes qu'il affecte, allant du coccus au bacille, avec des articles renflés en leur centre ou à l'une de leurs extrémités (Pl. IV, fig. 3).

Le plus grand nombre des éléments, colorés par le Gram, qu'ils prennent parfaitement, paraissent composés d'un grain ou d'une série de deux, trois grains colorés en violet foncé, inclus dans une enveloppe plus claire, effilée à l'une ou aux deux extrémités.

CULTURES

La culture en bouillon peptone est nulle ou à peine appréciable ; la présence d'un sérum, même en faible quantité, est indispensable pour obtenir un développement d'une certaine

importance; la culture est complète en quatre ou cinq jours, le milieu devient fortement acide.

La culture se fait en profondeur, au contact de la paroi du tube si celui-ci est incliné au lieu d'être maintenu debout; cette paroi se recouvre d'une couche grisâtre paraissant formée de petits amas microbiens séparés. Le liquide ne se trouble pas.

Une agitation modérée du tube met en suspension ces petits amas; si l'on insiste, tout se désagrège et le liquide se trouble uniformément, mais la sédimentation s'opère assez rapidement et le milieu reprend sa limpidité initiale.

La présence de craie dans le bouillon peptone sans sérum permet un développement assez appréciable; il n'y a jamais de dégagement gazeux, mais production d'une faible quantité d'indol.

Le sérum (mouton, chèvre) constitue un bon milieu de culture; dans le lait, le développement est rapide (brebis, chèvre, vache): le milieu est coagulé en dix-huit ou vingt-quatre heures, très acide, sans dégagement de gaz.

La gélose sérum montre une couche très mince, translucide, surtout appréciable au contact du liquide de condensation.

La gélatine, la gélose ordinaires, la pomme de terre, le sérum coagulé paraissent impropres à la culture du pyobacille.

A la température du laboratoire, on n'observe aucun développement. Enfin, les cultures anaérobies sont peut-être plus riches que celles qui s'effectuent au contact de l'air: le pyobacille est un anaérobie facultatif. Il est immobile.

Ce microbe ne se développe pas sur la gélose ordinaire; si l'on ensemence du pus sur ce milieu, le coccus non virulent, souvent associé au pyobacille, y pousse rapidement. Bientôt, par-dessus les colonies assez translucides de ce coccus, apparaîtront d'autres colonies plus petites, mais plus opaques, de pyobacilles.

Ces colonies de pyobacilles sont incomparablement plus riches, dans ce cas, que sur la gélose sérum elle-même.

Pour isoler le pyobacille des autres variétés microbiennes qui peuvent éventuellement l'accompagner, il est indispensable d'utiliser la gélose sérum ou, mieux, la gélose sang; la teinte foncée de ce dernier milieu permet une différenciation plus aisée des colonies: dans les espaces libres laissés entre les

colonies volumineuses des autres microbes, on verra apparaître un fin piqueté composé de colonies de pyobacilles. Leur apparition sera toujours en retard de vingt-quatre, quarante-huit heures sur celle des autres microbes.

On réussira encore à obtenir le pyobacille à l'état pur en pratiquant deux ou trois passages, de péritoine à péritoine, chez le cobaye.

Le pyobacille perd manifestement de sa virulence quand on le cultive en série sans passage par l'organisme animal.

Malgré l'acidité des milieux dans lesquels il se développe, le pyobacille conserve sa vitalité au moins deux mois à la température du laboratoire.

EXPÉRIMENTATION SUR LES DIFFÉRENTS ANIMAUX

COBAYE.

L'injection de 1 cent. cube de culture sous la peau provoque un œdème assez étendu et épais, qui se condense ; une petite poche purulente apparaît, s'ouvre au bout de deux à quatre jours, laissant une plaie ulcéreuse ; puis la cicatrisation s'opère assez rapidement : l'animal conserve un excellent état de santé et guérit.

Dans le péritoine, l'injection de 1-2 cent. cube *de culture* tue parfois l'animal en cinq à huit jours, dans un état cachectique complet. La séreuse péritonéale renferme un exsudat louche, plus ou moins teinté en rouge ; des fausses membranes sont disséminées à la surface des viscères et les anses intestinales sont accolées les unes aux autres. Sur le péritoine pariétal et l'épiploon sont répartis de petits abcès recouverts d'une mince enveloppe et renfermant une gouttelette de pus vert pâle d'une richesse extrême en pyobacilles. L'urine est albumineuse.

L'injection intra-péritonéale *de pus*, provenant d'une lésion du mouton ou de cobaye, provoque, au bout de deux ou trois jours, chez le cobaye mâle, une funiculite suppurée : un des testicules, ou les deux, ne peuvent plus rentrer dans la cavité abdominale ; le scrotum est tendu, rouge, luisant. A l'autopsie, on constate l'adhérence des feuillets séreux de la gaine vaginale et une quantité plus ou moins grande de pus ; le testicule dont le tissu propre peut être lésé est fixé au fond de la gaine vaginale.

Le VEAU (20 cent. cubes dans la veine), le LAPIN (1 cent. cube dans la veine), le PIGEON (1 cent. cube dans le muscle), la Souris blanche (1 cent. cube dans le péritoine) se montrent réfractaires au pyobacille.

20 cent. cubes de culture sous la peau du cheval ne donnent lieu à aucun trouble local ou général ; cependant 100 cent. cubes dans la veine provoquent une brève élévation thermique.

MOUTON ET CHÈVRE.

I. — *Injection sous la peau.*

Le 5 février 1911, un mouton d'un an (n° 430) né au laboratoire reçoit sous la peau de la cuisse droite 5 cent. cubes d'une culture de pyobacille en bouillon sérum âgée de trois jours. Le lendemain, un œdème chaud et douloureux, du volume d'un œuf de poule, entoure le point d'inoculation. La fluctuation apparaît dans les jours qui suivent. La poche purulente s'ouvre spontanément le 10 février et se vide, laissant une plaie profonde qui se comble rapidement.

Le 8 mars, la cicatrice est à peine visible. La température, qui s'est maintenue au-dessus de 40 degrés (max. 40°8) pendant quatre jours, descend ensuite lentement vers la normale qu'elle a repris le 10^e jour.

L'animal n'a pas présenté d'autres lésions et a toujours conservé un état de santé général excellent.

Le 17 février, trois agneaux de trois semaines, nés au laboratoire, sont inoculés sous la peau de la cuisse droite :

Le n° 437 reçoit 1 goutte de culture ;

Le n° 438 reçoit 2 gouttes ;

Le n° 439 reçoit 5 gouttes.

Seuls, les n°s 438 et 439 présentent chacun un volumineux abcès qui évolue et se cicatrise rapidement ; cependant, l'engraissement et l'augmentation de taille ont été nettement retardés, surtout chez le 439.

Le n° 437 n'a montré aucune trace de l'inoculation et a pris un embonpoint normal.

D'autres animaux, d'âges différents, ont encore reçu sous la peau des doses variables de pyobacilles : ces inoculations ont été bien supportées ; en tout cas, il n'y eut jamais généralisation de l'infection.

II. — *Injection dans le péritoine.*

Le 5 février 1911, une brebis d'un an, n° 429, née au laboratoire, reçoit dans le péritoine 5 cent. cubes de culture de pyobacille. L'animal maigrit rapidement : sa température oscille entre 40°5 et 41 degrés. Sacrifiée le 17 mars, de nombreuses adhérences réunissent les anses intestinales entre elles et à la paroi abdominale.

À la surface des intestins, on rencontre de nombreuses petites élévations rosées, en saillie de 1 à 1 cent. 1/2 et renfermant quelques gouttes de pus verdâtre renfermées dans une capsule charnue. Trois gros abcès, au niveau de la ligne blanche, font saillie sous la tunique abdominale.

Le pus de ces lésions est d'une richesse extrême en pyobacilles.

III. — *Injection dans l'œil.*

Le 5 février 1911, un mouton d'un an, n° 427, né au laboratoire, reçoit dans la chambre antérieure de l'œil droit une goutte de culture en bouillon sérum.

Dès le lendemain la cornée est opaque. Le 8, le contenu de l'œil est nettement purulent : la sclérotique est violemment congestionnée. La cornée s'ulcère et laisse sortir du pus verdâtre. Le 21, une gelée incolore, constituée par le cristallin, fait hernie par la perforation cornéenne. L'œil s'atrophie de plus en plus et les paupières le recouvrent complètement. Sacrifié le 19 mai, cet animal est en parfait état de graisse : l'œil est complètement atrophié ; la chambre antérieure n'existe plus, le globe oculaire forme une petite masse uniformément noire sur la coupe. Aucune autre lésion.

IV. — *Injection dans la mamelle.*

Le 5 février 1911, une brebis d'un an, n° 429, née au laboratoire, reçoit dans le trayon droit 1 cent. cube de culture de pyobacille. Le 8, on sent, dans la profondeur de l'organe, à la base du trayon, une induration du volume d'un œuf de pigeon.

Un mois après, on perçoit trois noyaux indurés. La ponction de ces noyaux donne issue à du pus verdâtre, crémeux, très riche en pyobacilles.

Une brebis de quatre ans, en pleine lactation, n° 449, reçoit le 21 mars 1911, une goutte de culture dans le trayon gauche. Dès le 23, la mamelle gauche est énorme, tendue, rouge, douloureuse ; du trayon, on fait sortir du pus verdâtre. Bientôt l'autre quartier s'infecte également : on sent, dans la profondeur de l'organe, des noyaux durs. Au 9 septembre, cette brebis, qui a toujours conservé un excellent état de santé, a le tissu mammaire complètement atrophié, mais on perçoit encore de petits noyaux indurés.

Au 13 novembre, toute trace d'infection semble avoir disparu.

V. — *Injection dans le vagin.*

A une vieille brebis, n° 454, en état de gestation, on injecte le 7 février, dans le vagin, 20 cent. cubes de culture : elle met bas, le 29 mars, une agnelle mort-née.

Les liquides amniotique et allantoïdien sont purulents, très riches en pyobacilles. Dans les jours qui suivent l'avortement, la vulve laisse écouler un mucus purulent et sanguinolent.

Le sang du cœur de l'avorton est stérile. Sacrifiée le 5 avril, cette brebis montre une métrite purulente ; l'utérus renferme un exsudat grisâtre peu abondant, avec grumeaux muqueux, culture mixte de pyobacilles et de streptocoque.

VI. — *Ingestion de pyobacilles.*

Le 13 avril 1911, on verse, dans la bouche de chacun des agneaux 484 et 485, âgés de trois semaines, le tiers environ d'un tube de culture en bouillon sérum. Le 28 avril, apparition d'une boiterie au membre postérieur droit. Le jarret droit s'engorge peu à peu, et, le 15 mai, montre un point fluctuant en avant. La ponction permet d'obtenir 2 cent. cubes de sérosité louche, jaunâtre, avec leucocytes, mais sans microbes au microscope. Cette sérosité,ensemencée, s'est montrée stérile.

N° 483. — Boîte du membre antérieur droit le 22 avril; le 24, le genou antérieur droit est augmenté de volume, chaud, douloureux, l'animal reste couché. Le 10 mai apparaît, à la face interne, un point fluctuant.

La ponction permet de recueillir de la sérosité rougeâtre avec grumeaux purulents. L'examen microscopique et la culture font voir que cette sérosité est stérile.

L'infection par le tube digestif est donc possible expérimentalement. Nous en étions déjà persuadé à la suite de la découverte, sur un mouton atteint de la maladie naturelle, d'un volumineux abcès ganglionnaire mésentérique rempli de pus très riche en pyobacilles.

Les deux agneaux 484 et 485 s'étant complètement rétablis n'ont pas été sacrifiés.

VII. — *Injection dans la veine.*

Le 5 février 1911, un mouton d'un an, n° 428, né au laboratoire, reçoit dans la jugulaire 1 cent. cube de culture de pyobacille en bouillon sérum, âgée de trois jours.

Le 10 février, apparition d'une boiterie accentuée du membre postérieur droit; l'animal maigrit à vue d'œil et ne peut bientôt plus se porter sur le membre malade. Sacrifié le 10 mars, ce mouton est d'une maigreur extrême. L'articulation fémoro-tibiale droite est augmentée de volume, noyée dans un engorgement diffus; en dégageant les muscles et les tendons qui l'enveloppent, on incise de petites poches purulentes. Les cartilages articulaires sont détruits; la surface des épiphyses est vivement enflammée, verruqueuse. La tête du fémur renferme un abcès gros comme une noisette (Pl. IV, fig. 4). Le pus verdâtre des lésions articulaires, péri-articulaires et osseuse est d'une grande richesse en pyobacilles. Le ganglion du flanc droit est énorme, succulent, long de 8 centimètres.

Aucune autre lésion.

Le 31 mars, une chèvre adulte, n° 464, reçoit dans la jugulaire 5 cent. cubes de culture. Le 3 avril, la chèvre présente de la raideur des quatre membres; le poil est piqué; le 4, elle boîte du membre postérieur droit qui est rapidement soustrait à l'appui; la palpation de l'articulation fémoro-tibiale est très douloureuse.

A partir du 16, l'animal ne peut plus se tenir debout. De nouvelles localisations apparaissent aux genoux, droit et gauche, puis au jarret gauche. On la sacrifie le 29 avril, elle est complètement cachectique. Sous la plèvre, on rencontre quelques petits abcès avec pus verdâtre riche en pyobacilles. Les articulations malades sont entourées d'abcès dont le pus a fusé entre les muscles et les brides tendineuses en les décollant. Les surfaces articulaires n'existent plus et sont remplacées par des surfaces tomenteuses, rugueuses, enflammées. La tête du fémur gauche renferme un petit abcès en communication avec l'articulation. Les ganglions de la voûte lombaire et poplitée sont énormes, succulents, mais non purulents.

LÉSIONS

Articulations. — L'articulation et les tissus environnants, conjonctif, osseux, peuvent être envahis par la suppuration. L'articulation est augmentée de volume, chaude, douloureuse :

de petits abcès plus ou moins confluents s'établissent entre les brides tendineuses et les muscles, qu'ils décollent. Les culs-de-sac tendineux et articulaires renferment du pus verdâtre et font saillie sous la peau.

Si l'articulation elle-même est envahie, le pus macère les cartilages articulaires, les détruit, laissant à leur place des surfaces tomenteuses, rugueuses, vivement enflammées.

L'inflammation ne va pas toujours jusqu'à la formation de pus et la ponction d'un point fluctuant de l'articulation peut ne donner issue qu'à de la synovie épaisse, d'une teinte rosée ou jaune plus ou moins intense. Parfois, enfin, la seule lésion consiste en un engorgement diffus des tissus au niveau de l'articulation.

Os (Lésion expérimentale). — La tête des os longs, au niveau d'une articulation malade, renferme parfois un ou deux petits abcès avec pus verdâtre ; la moelle osseuse peut être transparente, gélatiniforme, les vaisseaux capillaires s'y distinguent dans presque toute l'épaisseur du tissu.

Mamelle. — La lésion mammaire est constituée par des abcès plus ou moins nombreux, volumineux et profonds. Les conduits galactophores peuvent s'infecter et la mulsion permet d'obtenir par les trayons une quantité variable de pus épais, crémeux, verdâtre.

Certains de ces abcès s'ouvrent à l'extérieur et laissent une poche ou une fistule, dont la cicatrisation est très lente à s'opérer.

D'autres se résorbent au bout de quelques mois, et la mamelle reste complètement atrophiée.

Ganglions. — Nous avons rencontré, sur un animal atteint de la maladie naturelle, un volumineux abcès mésentérique avec pus d'une extrême richesse en pyobacilles.

Œil. — Le pus se forme dans la chambre antérieure : sous la pression interne, la cornée est refoulée en avant ; elle s'amincit en son centre, puis se déchire ; par la fistule ainsi créée, une petite quantité de pus s'écoule avec des fragments de tissus macérés.

Deux fois, nous avons constaté la sortie, par la fistule centrale de la cornée, d'un tissu blanchâtre s'étalant à la surface de l'œil, très fragile et semblant fixé au fond de l'œil.

La petite quantité de pus reste renfermée dans la chambre antérieure dès que la pression est égalisée; pour en obtenir une goutte, il convient de presser sur la cornée.

Le pus qui souille les paupières et s'écoule sur le chanfrein et les joues ne vient pas de l'intérieur de l'œil; il est créé *in situ* dans la cavité orbitaire souillée par les poussières et dont la profondeur varie avec l'état d'atrophie du globe oculaire et sa rétraction au fond de l'orbite.

Fait curieux, malgré la présence de pus dans la chambre antérieure pendant deux ou trois mois parfois, l'œil peut reprendre, en apparence, sa forme et presque son aspect normal; la vision est abolie, bien entendu. Mais, le plus souvent, le globe oculaire est complètement atrophié, rétracté au fond de l'orbite; une coupe de l'organe ne permet plus de différencier les différents tissus; il est uniformément noir, comme une petite truffe.

Cartilage auriculaire. — Nous avons signalé la grande fréquence de la nécrose du cartilage de l'oreille chez les animaux agalaxiques. Chez l'un d'eux, l'extrémité de l'oreille était le siège d'un chancre purulent; sous la peau, décollée, existait du pus verdâtre, très riche en pyobacilles.

Utérus (Lésion expérimentale). — L'utérus renferme un exsudat purulent grisâtre; les liquides amniotique et allantoïdien sont rougeâtres, purulents.

ÉTIOLOGIE

La clinique et l'expérimentation montrent que l'infection par le pyobacille se réalise par les voies digestives.

Nous avons rencontré, sur une brebis atteinte de la maladie naturelle, un volumineux abcès mésentérique à pus très riche en pyobacilles; de plus, par l'absorption d'une culture de pyobacilles, nous avons réussi à provoquer, chez deux agneaux, des lésions articulaires très nettes, mais fugaces.

Mais le tube digestif de l'animal sain et adulte ne semble pas se prêter au passage du pyobacille et à l'infection consécutive.

Pour créer des lésions comparables à celles de la maladie naturelle il convient d'injecter le virus dans la veine ou dans l'organe lui-même, œil et mamelle.

L'injection intra-veineuse amène à coup sûr des lésions articulaires et, parfois, des lésions oculaires et mammaires.

Pour que l'infection se réalise normalement, il faut de toute nécessité que l'organisme soit déjà fortement déprimé : cette dépression organique est réalisée par le virus de l'agalaxie.

Les animaux atteints d'agalaxie sont en général en très mauvais état et l'on conçoit très bien qu'ils soient aptes à se laisser infecter par un agent doué d'un certain pouvoir pathogène, insuffisant toutefois pour vaincre la résistance d'un animal sain.

Le pyobacille doit être assez répandu dans les bergeries : nous croyons l'avoir entrevu dans le pus du moignon de la queue chez des agneaux du Loiret, à une époque où notre attention n'avait pas encore été attirée spécialement sur lui ; aucun symptôme se rattachant au mal de Lure n'a été constaté d'ailleurs dans la suite chez ces agneaux.

Le mal de Lure est localisé dans les Basses-Alpes, la Vaucluse, le Var et les Alpes-Maritimes, c'est-à-dire dans les régions où sévit l'agalaxie contagieuse.

DIAGNOSTIC DIFFÉRENTIEL

Le mal de Lure n'a rien de commun avec les différentes lésions créées par le microbe de la suppuration caséuse. On peut rencontrer sur le même animal des abcès sous-cutanés et viscéraux (poumon) renfermant le microbe de Preisz-Nocard, et des lésions suppurées contenant le pyobacille, mais ces deux agents pathogènes ne se mélangent pas. Chacun d'eux se développe séparément et donne naissance aux lésions qui lui sont propres.

L'examen microscopique et les cultures seront nécessaires cependant pour différencier les suppurations articulaires et mammaires ; cliniquement on ne peut les distinguer. Mais la suppuration de l'œil est absolument le fait du pyobacille.

Je crois devoir attirer l'attention sur les difficultés rencontrées à chaque pas dans l'étude de ces affections mixtes sur un même animal et sur la circonspection qu'il convient d'apporter dans l'appréciation du rôle pathogène de chacun des virus.

Cependant les résultats expérimentaux sont très nets; le microbe de la suppuration caséreuse peut, à lui seul, sur l'animal sain, créer toutes les localisations bien connues actuellement, le pyobacille ne peut évoluer que sur des sujets déjà atteints d'agalaxie.

C'est dire que le mal de Lure ne saurait être constaté dans les régions indemnes de cette affection.

Le pus du mal de Lure a la même teinte verdâtre que le pus dû au microbe de Preisz-Nocard, mais jamais il n'acquiert la consistance de ce dernier, il reste toujours assez liquide.

ESSAIS DE VACCINATION

L'injection d'une goutte de culture de pyobacille vivant, non atténué, étant parfaitement tolérée, sans réaction locale le plus souvent, même chez de très jeunes animaux, nous avons logiquement été amené à tenter l'immunisation active.

A plusieurs reprises nous avons injecté, sous la peau d'animaux d'expériences d'âges différents, des doses minimales mais croissantes, de virus non atténué.

Ces injections furent bien supportées, mais l'épreuve de l'immunisation, si toutefois celle-ci était réalisée, ne nous fournit que des déboires.

Nous ne pouvions songer à essayer la résistance de nos vaccinés en leur faisant absorber des cultures de pyobacilles, puisque ce mode d'infection ne réussit qu'exceptionnellement au laboratoire.

Force nous fut d'utiliser la voie veineuse et nous dûmes constater que vaccinés et témoins se montraient aussi sensibles les uns que les autres à l'injection : l'apparition de lésions articulaires démontrait le peu de cas qu'il convenait de faire de la vaccination.

Cependant, sur quelques centaines d'animaux, en pays infecté, M. Arlaud, vétérinaire départemental des Basses-Alpes, voulut bien essayer la vaccination. Les résultats parurent satisfaisants puisque, cette année, plusieurs propriétaires m'ont demandé de nouveau du vaccin. Je me suis empressé de leur donner satisfaction, mais, personnellement, j'avoue ne pas avoir grande confiance dans la valeur de la méthode. Peut-être cette

vaccination se montrera-t-elle capable d'empêcher l'apparition des lésions suppurées, mais, à coup sûr, elle n'aura aucune action sur l'infection agalaxique primitive.

C'est contre l'agalaxie que les mesures hygiéniques et prophylactiques doivent être prises; cette maladie étant vaincue, le mal de Lure disparaîtra.

Tous nos efforts vont porter de ce côté maintenant.

CONCLUSIONS

I. — Le mal de Lure n'est qu'une complication de l'agalaxie contagieuse du mouton et de la chèvre : c'est une pyohémie spéciale.

II. — L'agent spécifique, que nous avons découvert, et auquel nous avons donné le nom de pyobacille du mouton et de la chèvre, est doué d'un pouvoir pathogène élevé.

III. — Les animaux sont d'autant plus sensibles à son action qu'ils sont plus jeunes.

IV. — Si l'injection sous-cutanée est, en général, bien tolérée, par contre, le dépôt du virus dans la veine, dans l'œil, dans la mamelle permet de réaliser l'infection et d'obtenir les lésions typiques de la maladie.

V. — Le pyobacille constitue une nouvelle variété microbienne capable de provoquer, chez le cobaye mâle, le signe de Strauss, la vaginalite et l'orchite suppurées.

VI. — Le mal de Lure est un nouvel exemple d'une infection secondaire spécifique se greffant sur une première infection et en augmentant la gravité.

VII. — Cette complication paraît absolument propre aux ovins et caprins du sud-est de la France. Elle est inconnue sur les moutons atteints d'agalaxie, en si grand nombre dans les régions centrale et méridionale de l'Italie.

VIII. — Il paraît inutile de chercher à prévenir le mal de Lure; tous les efforts prophylactiques doivent être dirigés contre l'agalaxie contagieuse, cause première de l'affaiblissement organique permettant le développement du pyobacille.

DES INFECTIONS SECONDAIRES

DANS LA TUBERCULOSE ULCÉREUSE DU POUMON

par A. VEILLON et G. REPACI

Quand on songe aux conditions dans lesquelles se trouvent la plupart des cavernes tuberculeuses, on conçoit facilement qu'elles puissent être le siège de nombreuses infections secondaires. A demi remplies de matière caséeuse, de pus, qui font un excellent milieu pour les cultures microbiennes, formées d'une paroi pathologique en voie de destruction, qui n'offre aucun moyen de défense, elles semblent vouées forcément à un envahissement parasitaire intense. Cependant, si la caverne tuberculeuse est bien disposée pour laisser pulluler les microbes, faut-il encore que ceux-ci puissent y pénétrer, il faut qu'il y ait ensemencement. La communication avec les bronches, et par suite avec le nez, la bouche et l'air extérieur, constitue une voie toute naturelle pour cette pénétration. Mais nous savons que l'air atmosphérique se purifie en passant par le nez, la bouche et les voies respiratoires supérieures car les particules solides sont retenues par les parois humides de ces cavités et nous savons aussi que les bronches se défendent par un mécanisme biologique bien connu en détruisant les microbes qui n'ont pas été retenus mécaniquement.

On conçoit donc qu'une caverne puisse échapper à l'infection secondaire et, en fait, nous verrons que cela existe. En réalité, l'abondance des sécrétions qui lèsent la muqueuse et l'empêchent de se défendre utilement, la stagnation de ces sécrétions qui arrivent à faire un milieu de culture étendu à tout l'arbre respiratoire, la permanence même de ces conditions favorisantes font qu'à un moment donné il doit se faire un ensemencement de la caverne et c'est ce que l'on constate le plus souvent.

Koch, qui avait trouvé le microbe de la tuberculose, a aussi donné les premières indications au sujet des infections secondaires.

Il fait très justement remarquer que parmi les nombreuses espèces bactériennes que le hasard fait pénétrer dans les cavernes, un petit nombre sera capable de se développer et quelques-unes seulement pourront jouer un rôle pathologique. Depuis ces recherches de Koch (1884), nombre d'auteurs (1) se sont attachés à confirmer ou infirmer le rôle pathologique de ces infections secondaires, les uns ne leur attribuant aucune importance, les autres allant jusqu'à dire que le bacille de la tuberculose ne pourrait rien sans l'aide des autres microbes.

Nous ne reviendrons pas sur l'historique de ces travaux, qui a été maintes fois fait; disons seulement que les recherches ont porté exclusivement sur l'étude des microbes aérobies et qu'il semble bien résulter de l'ensemble de ces travaux que, si l'infection secondaire par ces microbes est presque constante, elle ne semble pas jouer un rôle important.

Nous savons maintenant que le bacille de Koch à lui seul peut faire la granulation tuberculeuse, que c'est lui qui amène la dégénérescence caséeuse, qu'il est enfin capable de provoquer des inflammations pneumoniques, broncho-pneumoniques et pleurales, qu'il est la principale cause de la fièvre et de la cachexie tuberculeuse. On constate cependant, dans de nombreux cas de tuberculose ulcéreuse, des phénomènes que la seule présence du bacille de Koch ne saurait expliquer; c'est la fétidité de l'haleine, la putridité des sécrétions, l'aspect gangreneux des cavernes et enfin, dans quelques cas, un pyo-pneumothorax à épanchement putride.

Il semble que ce côté des infections secondaires, dans la tuberculose pulmonaire, ait été négligé par tous les auteurs qui se sont occupés de la question, et c'est pour cela que nous avons entrepris de nouvelles recherches sur ce sujet.

TECHNIQUE.

Pour nos examens nous nous sommes servis des crachats de malades atteints de tuberculose ulcéreuse, des sécrétions recueillies dans l'intérieur des cavernes au cours des autopsies

(1) On trouvera l'analyse de ces travaux et les indications bibliographiques dans la thèse de Halbron. Tuberculose et infections associées. *Thèse de Paris*. 1906.

et enfin du tissu pulmonaire lui-même; dans quelques cas nous avons aussi examiné le pus de pleurésies, le sang de la circulation générale, etc.

Pour les crachats nous faisons expectorer le malade dans une boîte de Petri stérilisée et, immédiatement, un petit fragment est détaché avec un instrument flambé.

Ce petit fragment, lavé successivement dans plusieurs tubes (7 à 8) d'eau stérilisée, servait ensuite aux examens microscopiques, aux ensemencements, aux inoculations. Cette technique est d'ailleurs classique pour l'étude des crachats, car elle permet d'éliminer en grande partie les microbes de la bouche.

Les sécrétions des cavernes, le suc pulmonaire, le sang du cœur étaient recueillis comme d'habitude avec des pipettes flambées qui servaient à aspirer le liquide à travers une paroi préalablement stérilisée par le fer rouge.

Le matériel, ainsi recueilli avec toutes les précautions d'asepsie, était soumis à trois ordres de recherches : examen microscopique à l'état frais et après coloration par des procédés variés; cultures sur différents milieux; inoculations à la souris, au lapin, au cobaye.

Dans ces différentes manipulations, nous nous sommes toujours attachés à employer des méthodes multiples pour pouvoir mettre en lumière le plus grand nombre d'espèces bactériennes. Dans une question aussi complexe, il fallait en effet éviter l'écueil qui consiste à ne trouver qu'une ou deux espèces bactériennes dans un cas où il en existe beaucoup d'autres, ou bien à ne trouver que l'espèce qu'on recherche *a priori*.

Les résultats concordants des cultures et des préparations faites directement avec le matériel ensemencé nous prouvaient que notre technique était bonne. Donc, pour chaque cas, on faisait des préparations à l'état frais, des préparations colorées par la méthode de Gram, par le liquide de Ziehl dilué, par le liquide de Ziehl à chaud suivi d'une décoloration par l'acide nitrique dilué au tiers.

Les ensemencements pour cultures d'aérobies étaient faits sur tubes de gélose ordinaire, sur tubes de gélose ensanglantée, tubes de gélose ascite et sérum coagulé; pour les cultures des anaérobies nous avons employé les tubes de gélose sucrée en couche profonde.

Pour faire lesensemencements en surfaces on prend le matériel avec une aiguille de platine flambée, et on le porte sur la surface d'un tube de gélose; on a soin de délayer le petit fragment de crachat ou de pus dans le liquide exsudé au fond du tube et on l'étale sur la surface de gélose; sans recharger l'aiguille, on recommence la même opération sur un second, un troisième tube, etc. On fait ainsi de véritables plaques en surface où toutes les colonies poussent bien isolées. On ensemeence plus ou moins de tubes, selon la richesse bactérienne du matériel.

Pour pratiquer l'isolement des microbes anaérobies, nous avons employé la technique indiquée par l'un de nous et que nous décrirons rapidement à nouveau, parce qu'il semble qu'elle n'ait pas toujours été bien comprise et parce qu'elle a subi des perfectionnements depuis qu'elle a été publiée.

Le milieu que nous employons est de la gélose à 40 p. 1000, préparée avec la macération habituelle de viande (500 grammes pour 1000 d'eau); on y ajoute 5 grammes de sel marin, 10 grammes de peptone, 15 grammes de glucose et 1 gramme de nitrate de potasse (1). Le mélange cuit à l'autoclave est alcalinisé et collé avec du blanc d'œuf, chauffé à nouveau, filtré sur papier Chardin, distribué dans des tubes et stérilisé comme d'habitude. Il faut emplir les tubes sur une hauteur d'environ 10 centimètres. Le milieu doit être très clair et transparent.

Pour faire l'ensemencement, on fait fondre au bain-marie à 100 degrés un nombre de tubes proportionné à la richesse en microbes du produit à examiner (une dizaine de tubes environ). On les fait refroidir dans de l'eau à 38 degrés, puis, se servant d'une pipette à longue effilure comme d'une aiguille de platine, on prélève un peu de semence et on secoue la pipette successivement dans les tubes, sans la recharger, pour faire des dilutions. Les tubes sont plongés dans l'eau froide pour les solidifier et ensuite mis à l'étuve. Si les dilutions ont été bien faites, les colonies se développent bien séparées les unes des autres. Les microbes aérobies stricts poussent dans la zone supérieure aérée, qui n'excède pas deux centimètres de hauteur; les anaérobies stricts ne poussent que dans la zone inférieure privée d'oxygène. Les facultatifs évidemment poussent dans toute la hauteur du tube.

Pour faire la prise des colonies on se sert d'une pipette à longue effilure, brisée à l'extrémité, qu'on introduit à travers le milieu après flambage, jusqu'à la colonie qu'on désire prélever, et on la fait monter dans la pipette par de très légers mouvements de va-et-vient.

Pour cette pêche de la colonie, il est préférable de se servir du tube Guillemot. Pour cela on prend un tube de caoutchouc souple de calibre propor-

(1) Le nitrate de potasse est ajouté au milieu pour empêcher la production des bulles de gaz (hydrogène) qui fragmentent la gélose et empêchent l'isolement. Voir Veillon et Mazé. De l'emploi des nitrates pour la culture et l'isolement des microbes anaérobies. *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 22 janvier 1910.

tionné aux pipettes employées, long environ de 40 centimètres. On fixe une de ses extrémités à la pipette et l'autre extrémité est reçue dans la bouche. Il est alors facile, en aspirant légèrement, de cueillir la colonie qu'on touche avec l'extrémité de la pipette effilée. Bien entendu, au cours de ce prélèvement, il faut avoir soin de faire cheminer l'effilure de la pipette entre les diverses colonies et de ne toucher que celle qu'on veut prélever pour pouvoir obtenir des cultures pures. La petite portion de colonie ainsi prélevée est transplantée avec les soins habituels dans un autre tube préalablement fondu, on chasse la colonie de la pipette en soufflant légèrement par le tube de caoutchouc. On obtient ainsi des cultures pures de toutes les colonies qu'on a choisies.

Pour ensemençer dans la gélatine, on suit le même procédé. On se sert ensuite des cultures pures pour faire desensemencements dans le bouillon ou sur différents milieux par les procédés classiques.

Nous avons dit, ailleurs, les avantages de ce procédé d'isolement; il a continué à donner d'excellents résultats et c'est lui que nous employons toujours. Il faut avoir soin de prélever toutes les colonies qui paraissent différentes; on doit remettre les tubes à l'étuve même après prélèvement, car certaines espèces poussent lentement, ou bien des colonies qui, au début, semblaient identiques se différencient peu à peu.

RÉSULTATS OBTENUS.

Par l'emploi de cette technique, nous avons obtenu des résultats intéressants.

Dans un petit nombre de cas nous avons constaté que certaines cavernes ne contenaient pas de microbes autres que le bacille de Koch; ces cavernes avaient une paroi infiltrée de tubercules et leur cavité contenait une matière caséuse blanc grisâtre typique. Les examens microscopiques, les cultures en milieu aérobie ou anaérobie ont montré qu'il n'y avait pas d'infection secondaire. Cette évolution pure de la tuberculose, qui se fait ordinairement ainsi dans les organes fermés comme le foie, le rein, etc., est exceptionnelle dans le poumon; la communication avec une bronche amène bientôt l'invasion de bactéries surajoutées.

C'est en effet ce que nous avons constaté et nous pouvons diviser les faits observés en deux classes.

Dans une première classe nous avons trouvé exclusivement des microbes aérobies ou facultatifs, et voici les espèces microbiennes les plus fréquentes :

Streptocoque de la salive, Streptocoque pyogène,
 Staphylocoque blanc, Staphylocoque doré,
 Pseudo-méningocoque,
 Bacille de Friedlander, Bacille pseudo-diphtérique,
 Proteus (Une seule fois et très rare),
 Sarcine (Une seule fois et très rare),
 Coccus non identifié (Une seule fois et très rare).

Ces microbes ont été trouvés dans les crachats ou dans les cavernes, mais jamais dans le tissu pulmonaire ni dans le sang de la circulation générale.

On voit que, dans cette série de faits, nous n'avons observé rien qui ne soit connu, et nous n'insisterons pas. Répétons seulement qu'à notre avis, ces infections ne semblent pas imprimer une évolution spéciale à la maladie; l'aspect des cavernes, des crachats, n'offre rien qui ne soit banal. Il est bien entendu, cependant, que, dans certains cas (nous n'avons pas eu l'occasion d'en observer), ils peuvent être la cause de broncho-peumonie, de pleurésie purulente, mais ces cas sont exceptionnels, et ces microbes peuvent pulluler longtemps dans les cavernes sans causer ce genre de complication.

Nous arrivons enfin à une troisième classe de faits qui, jusqu'à présent, n'ont pas fait l'objet de recherches systématiques. En appliquant notre technique pour la culture des anaérobies, nous avons vu que l'infection par cette classe d'organismes n'était pas rare et nous avons pu isoler les espèces suivantes. Nous les énumérerons en suivant l'ordre de l'importance du rôle qu'ils jouent d'après leur abondance dans les tissus malades, leur fréquence, leur valeur pathogène.

Bac. Ramosus, *Bac. Fragilis* (variété Veillon et Zuber),
Bac. Fragilis (variété Guillemot),
Micrococcus Fætidus,
Streptococcobacille de Veillon et Morax ou *Bac. Ramosoïdes*,
Staphylococcus Parvulus,
Bac. Funduliformis, *Bac. Perfringens*, *Bac. Nebulosus*,
Bac. Furcosus,
Streptococcus parvulus,
Spirillum crassum,
Vibrio tenuis.

Nous ne referons pas l'histoire de quelques-uns de ces

microbes, qui ont été décrits dans un travail antérieur (1) et qui ont été retrouvés par de nombreux auteurs dans des maladies diverses. Nous dirons cependant que le Streptococcobacille (2) (Veillon et Morax), que nous retrouvons ici, est vraisemblablement identique au Bac. Ramosoïdes de Runeberg (3), qui a eu le grand mérite de l'étudier plus complètement et surtout d'en montrer la polymorphie. Le Streptococcus parvulus est un petit coccus très fin, légèrement ovoïde, lancéolé, en diplocoque, formant de petites chainettes souvent accolées les unes contre les autres, en amas. Il donne dans la gélose des colonies granuleuses à bords nets et lisses. Rencontré plusieurs fois par l'un de nous, par Guillemot, il est vraisemblablement identique au très fin streptocoque trouvé par Lewkowicz dans la bouche des nourrissons, par Lippmann dans des infections biliaires, par Jeannin dans des infections puerpérales.

Nous parlerons plus longuement des deux espèces suivantes, qui n'ont pas encore été décrites :

Spirillum crassum. — Cet organisme, dans le pus ou les tissus malades, se présente sous l'aspect d'un fuseau très effilé, le plus souvent incurvé, quelquefois en forme de croissant. Quand les éléments sont unis deux par deux, leurs courbures sont en sens inverses et forment ainsi un S italique allongé. Examiné à l'état frais, il est mobile par des mouvements de translation et de rotation. En culture, on voit des formes analogues, mais il tend à s'allonger, et le filament apparaît comme un spirille à spires peu serrées et toujours courtes.

Les éléments provenant des cultures sont extrêmement mobiles; ils se déplacent avec une grande rapidité, souvent par un mouvement de va-et-vient en avant et en arrière; certains éléments, qui sont immobiles, se détendent brusquement comme un ressort et se mettent rapidement en marche, pour

(1) VEILLON, Sur un microcoque strictement anaérobie trouvé dans les suppurations fétides, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1893. VEILLON et ZUBER, Sur quelques microbes strictement anaérobies et leur rôle dans la pathologie. *Arch. de Méd. expériment.*, juillet 1898.

(2) VEILLON et MORAX, Péricystite gangréneuse. *Annales d'Oculistique*, 1900.

(3) BIRGER RUNEBERG, Studien über die bei peritonäalen Infektionen appendicularen Ursprungs vorkommenden sauerstofftoleranten sowie obligat anaeroben Bakterienformen mit besonderer Berücksichtigung ihrer Bedeutung für die Pathogenese der artigen Peritonitiden. Berlin, 1908.

s'arrêter bientôt non moins brusquement. Ce spirille est pourvu de cils très longs et très fins qui s'implantent aux extrémités et aussi le long du corps.

Il se colore par le violet de gentiane, et surtout par la fuchsine de Ziehl ou le Giemsa. Il ne se colore pas par la méthode de Gram. Les colonies dans la gélose ont des caractères assez



FIG. 1. — *Spirillum crassum*. Culture en gélose sucrée de 48 heures. Formes jeunes et courtes, pour montrer les cils. — Grossissement : 1800 d.

spéciaux. Au bout de quarante-huit heures de séjour à l'étuve, la colonie forme un point à peine visible à l'œil nu, mais qui apparaît au microscope comme une masse sphérique, jaunâtre, très granuleuse. En suivant le développement au microscope, la masse devient jaunâtre, mais plus foncée; les bords lisses sont ondulés et bientôt s'estompent. La colonie, à l'œil nu, prend alors l'apparence d'une masse blanche, très finement nuageuse; ce nuage est plus ou moins dense, cotonneux d'aspect, selon la consistance du milieu (richesse en gélose). Les cultures en bouillon sont peu abondantes; il se forme un léger

trouble et un léger précipité au fond du liquide qui s'éclaircit. Il ne pousse qu'à la température de l'étuve. Il est peu résistant et il faut le réensemencer tous les quatre à cinq jours.

Il ne donne pas de gaz, mais les cultures sont nettement fétides.

Il est peu pathogène pour le lapin, mais donne des abcès gangreneux au cobaye sous la peau duquel on l'a inoculé, et qui succombe quelquefois.

Ce spirille, que nous avons trouvé souvent comme infection secondaire dans la tuberculose ulcéreuse, avait déjà été rencontré par l'un de nous dans le pus d'une pleurésie putride et dans la bouche. Dans l'angine de Vincent, ce qui est appelé bacille fusiforme serait constitué par deux espèces différentes : un bacille fusiforme, immobile, anaérobie, et ce spirille, dont les éléments, dans les tissus pathologiques, sont en forme de fuseaux légèrement incurvés. Nous l'avons, en effet, cultivé en partant d'angines ulcéreuses, et c'est ce qui explique la divergence des auteurs, dont les uns considèrent le bacille fusiforme de l'angine de Vincent comme mobile et les autres comme immobile.

Vibrio tenuis. — Cet organisme, dans le pus ou les tissus, se présente sous la forme d'un bâtonnet très court et extrêmement fin ; une des extrémités est plus effilée que l'autre, ce qui lui donne l'aspect d'une *virgule*. Nous le répétons, il est extrêmement petit et passe très facilement inaperçu dans des préparations contenant d'autres microbes qui attirent l'attention. Dans les cultures en milieu artificiel, les éléments sont un peu plus longs ; unis souvent deux à deux, ils prennent la forme d'un S italique et, en réalité, on voit qu'il s'agit d'un spirille très court à spire allongée. Sa mobilité est très vive, mais difficile à observer ; on peut examiner pendant longtemps des préparations contenant des amas abondants de ce microbe sans qu'il semble se déplacer, mais si on concentre son attention sur un point, notamment vers la périphérie d'un amas, on voit un des éléments se détendre brusquement, comme un ressort, et se déplacer avec une grande rapidité en roulant sur lui-même ; quelquefois, après quelques secondes seulement, les mouvements s'arrêtent d'un seul coup pour recommencer plus tard. Dans certaines préparations, un grand nombre d'éléments

se déplacent en même temps et on a l'image classique d'un essaim de moucheron. Toutes ces constatations sont difficiles à cause de la petitesse extrême de ce microbe.

Il ne se colore pas par la méthode de Gram.

Il se colore assez bien par les autres méthodes, fuchsine de Ziehl, liquide de Giemsa. Par la méthode de Loeffler, on constate qu'il porte à une de ses extrémités ou implanté sur le corps, du côté de sa concavité, un seul cil, long, très fin.

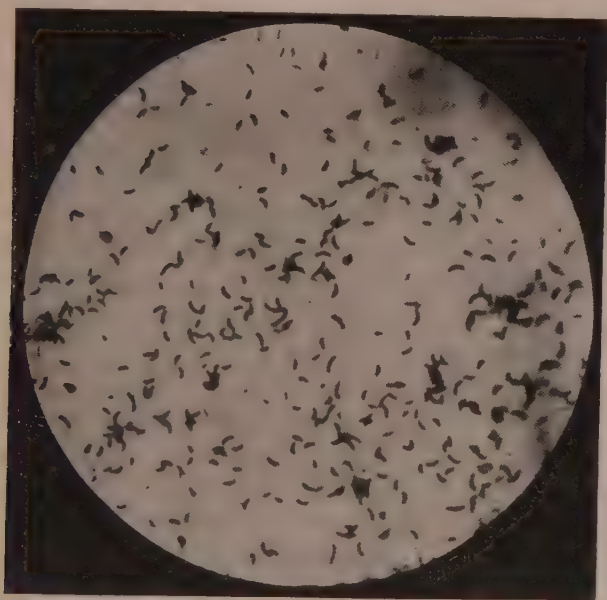


FIG. 2. — *Vibrio tenuis*. Culture en gélose de 4 jours. Éléments incurvés et en forme d'S italique. — Grossissement : 1800 d.

Il ne se développe qu'à la température de l'étuve. Les colonies, dans l'épaisseur de la gélose, apparaissent au bout de quarante-huit heures comme des points granuleux très fins; elles s'entourent d'un halo qui estompe la petite masse centrale, de sorte que, au microscope, la colonie est formée d'un noyau sombre entouré d'un nuage extrêmement fin, qui va en s'aminuisant à tel point qu'on n'en peut distinguer la limite périphérique. A cette période, la colonie, à l'œil nu, apparaît comme un nuage très fin, transparent, avec un point central

plus opaque. Les colonies de ce vibrion ressemblent donc à celles du *Spirillum crassum* décrit plus haut, mais elles sont plus fines, plus transparentes et plus petites. Les colonies, d'ailleurs, sont plus ou moins opaques selon que le milieu est plus ou moins chargé en gélose.

Les cultures répandent une odeur fétide, mais il n'y a pas de production apparente de gaz.

En bouillon, la culture est très pauvre; il forme un léger nuage, à peine visible, qui se précipite.

Il est peu résistant, il faut le réensemencer tous les dix jours environ.

Il paraît très peu pathogène pour les animaux.

Ce vibrion se retrouve à l'état normal dans la bouche et, comme le *Spirillum crassum*, il pullule sur toutes les plaies de la bouche, il envahit facilement les dents cariées, les abcès dentaires; on le trouve dans les infections bronchiques.

Ces deux organismes envahissent facilement les organes respiratoires des tuberculeux et, s'ils ne sont pas très pathogènes, ils contribuent pour une large part à donner l'odeur fétide des exsudats.

On voit que ces espèces microbiennes appartiennent pour la plupart à des espèces connues; d'autres avaient déjà été vues, mais insuffisamment étudiées.

Nous les avons rencontrées dans les crachats, dans les cavernes, dans le tissu infiltré et enfin dans des complications plus éloignées, gangrènes pulmonaires, pleurésies. Elles nous paraissent importantes parce qu'elles impriment à l'évolution de la tuberculose des caractères spéciaux.

Les crachats muco-purulents, très abondants, sont plus liquides, plus colorés, en jaune, en brun: la destruction des leucocytes y paraît beaucoup plus avancée et la richesse en microbes est considérable, comme dans les crachats de gangrène pulmonaire, et enfin ils sont fétides et donnent à l'haleine du malade une odeur spéciale. Le contenu des cavernes, au lieu d'avoir le caractère des matières caséeuses, est moins compact, plus coloré; il a souvent un aspect putrilagineux et l'odeur fétide. Les parois des cavernes sont aussi modifiées: elles sont beaucoup plus déchiquetées, de couleur brunâtre.

Secoué dans l'eau, une partie du tissu putréfié s'enlève facilement et la paroi ressemble à une masse d'étaupe.

Par l'examen microscopique on constate aussi des lésions intéressantes. La matière caséuse est constituée par un putrilage où on ne trouve plus de cellules, ni même de débris de noyaux cellulaires; en revanche on constate une véritable purée de microbes de différentes formes. Le tissu des parois caverneuses, d'aspect gris sale, nous a montré, dans les coupes colorées, trois zones : une zone sphacélée où le tissu n'a plus de texture et fourmille de microbes variés; une zone leucocytaire où l'on voit des leucocytes dont les uns sont en voie de destruction et parmi lesquels se retrouvent encore des microbes de la zone sphacélée, mais moins nombreux; enfin, une zone congestive, où l'on voit un état pneumonique avec de la congestion, de petites hémorragies, et çà et là des tubercules. Dans un cas la destruction gangréneuse était très avancée et, en certains points, on ne voyait que les lésions décrites plus haut, sans tubercule.

On voit donc que les crachats, le contenu de la caverne et la paroi de la caverne elle-même subissent une transformation spéciale, en relation avec la pullulation de ces microbes anaérobies; cette transformation peut se caractériser par un mot : c'est le processus putride.

Comme nous l'avons vu, ces microbes anaérobies pénètrent profondément dans le tissu de la paroi: ils peuvent aussi pénétrer jusque dans le tissu pulmonaire sain, ou relativement sain, et y causer de petits foyers de gangrène pulmonaire, comme nous l'avons observé dans un cas. Lorsqu'une caverne est proche de la plèvre, elle peut infecter cette cavité par contiguïté, ou même s'ouvrir à son intérieur, et il se produit alors une pleurésie putride dans le pus de laquelle nous retrouvons ces mêmes espèces microbiennes, comme nous l'avons vu dans une de nos observations.

Dans presque tous les cas, la flore est riche et complexe, c'est-à-dire que les microbes sont très nombreux et appartiennent à plusieurs espèces, non seulement anaérobies, mais aussi aérobies ou facultatives; mais la présence des anaérobies stricts existe toujours quand on constate le processus putride dont nous avons parlé plus haut.

D'autre part, l'état général paraît nettement influencé par ce genre d'infection secondaire, la fièvre hectique semble plus marquée, les malades présentent un facies un peu spécial, le teint est plombé, la peau est terreuse, il y a un peu de subictère, de la diarrhée, une faiblesse plus grande, et la terminaison fatale est plus rapide.

Pouvons-nous avoir une action sur ces infections secondaires ? Il semble que la thérapeutique est bien désarmée, les médicaments internes ne nous ont donné aucun résultat ; mais nous avons certainement atténué l'évolution de ce processus putride en maintenant, dans la pièce où est le malade, un récipient d'eau bouillante additionnée de teinture de benjoin : l'expectoration était plus facile et un peu moins fétide.

CONCLUSIONS.

1° Dans certains cas, très rares, les cavernes tuberculeuses ne contiennent que le bacille de Koch, sans infection secondaire.

2° Le plus souvent les cavernes tuberculeuses sont envahies par une pullulation secondaire de microbes variés.

3° Les microbes aérobies ou facultatifs forment l'infection secondaire banale, ils n'impriment pas à la maladie primitive un caractère spécial.

4° Les microbes anaérobies stricts envahissent assez souvent les cavernes tuberculeuses ; ils constituent une infection secondaire intéressante, parce qu'ils impriment à la maladie des caractères spéciaux, fétidité des crachats, processus gangréneux des parois de la caverne, ou sont même la cause de complications importantes : gangrène pulmonaire, pleurésie putride, aggravation de l'état général.

5° Le processus putride et gangréneux, survenant chez les tuberculeux à la période caverneuse, est toujours sous la dépendance d'une pullulation de microbes anaérobies stricts.

ÉTUDES SUR LE PNEUMOCOQUE

IV. — AGGLUTINATION DES PNEUMOCOQUES HUMAINS ET ANIMAUX

par L. COTONI et Ch. TRUCHE

Le phénomène de l'*agglutination* — tel qu'on le réalise quand on soumet une émulsion microbienne (en eau physiologique) à l'influence d'un sérum actif — *résulte* du jeu réciproque de deux facteurs : l'*agglutinabilité* du microbe et le *pouvoir agglutinant* du sérum. Aussi, pour comparer entre eux divers échantillons d'une même espèce de germes, les fait-on « défiler » devant un sérum agglutinant pris comme type et, inversement, pour comparer entre eux divers échantillons de sérums actifs sur cette espèce, les fait-on « défiler » devant un germe agglutinable pris comme étalon. Cette méthode *symétrique* rend d'incontestables services lorsque le sérum est « très fort » ou le microbe « très agglutinable », c'est-à-dire quand ils possèdent une sphère d'action ou de sensibilité fort étendue. Mais l'*individualité* parfois très accentuée des *germes* et la *spécificité* corrélatrice des *sérums* peuvent imposer une limite aux résultats et on se trouve alors amené à des expériences d'une extrême complexité. S'il faut faire « défiler » les microbes devant deux, trois, quatre... sérums et inversement, les recherches deviennent bientôt impraticables et, disons-le, sans intérêt aucun, puisqu'elles ne peuvent mener qu'à une conclusion prévue à l'avance, celle de l'extrême variation des germes d'une même espèce. Tel est le cas pour les pneumocoques et nos expériences nous ont montré le peu de valeur de l'agglutination dans le diagnostic des échantillons et dans celui des sérums. D'autres espèces microbiennes offrent une moindre tendance à l'individualisation de leurs représentants et, pour elles, l'agglutination constitue, dans des limites quelquefois assez étendues, un critérium dont nous ne songeons point à contester l'importance.

Notre « matériel biologique » se compose de : 31 échantillons de

pneumocoques (21 pn. humains, 6 pn. du cobaye, 3 pn. du lapin, 1 pn. du cheval — déjà mentionnés dans nos publications antérieures), — de 38 sérums d'individus atteints d'infections pulmonaires à *pneumocoques* — de deux sérums « immuns » (cheval et mouton) — et, naturellement, de nombreux sérums normaux (humains, équins, ovins). Les sérums « immuns » ont été préparés en injectant, sous la peau d'un cheval et d'un mouton, des quantités marquées de substance pneumococcique vive. Nous avons choisi, à cet effet, un échantillon devenu avirulent (dit échantillon A, dont il a été parlé dans notre premier travail). Les cultures de vingt-quatre heures en milieu T (voir ce travail) étaient centrifugées avec l'appareil de Jouan et les culots émulsionnés à l'eau physiologique. On obtenait environ 3 centigrammes de pneumocoques vivants par 10 cent. cubes de culture (1). Les détails de l'immunisation seront publiés en temps et lieu.

Pour étudier le phénomène de l'agglutination, nous nous sommes arrêtés à la technique suivante :

Les cultures de vingt-quatre heures, en milieu T, étaient centrifugées : les culots pesés exactement et émulsionnés en eau physiologique, de façon à obtenir 1 milligr. 1/2 par cent. cube. On faisait agir, sur chaque cent. cube d'émulsion, des quantités variables de chaque sérum ; puis, on bouchait les tubes et on les abandonnait vingt-quatre heures à 37 degrés. On comptait comme positifs tous les cas où 1/6 de cent. cube de sérum (ou moins) agglomérail complètement 1 cent. cube d'émulsion (c'est-à-dire 1 milligr. 1/2 de germes). Ces conditions expérimentales n'ont pas été, bien entendu, décrétees *a priori* ; elles se sont montrées les meilleures à la suite de recherches d'orientation. — Ajoutons que si l'on compare, au point de vue agglutination, des cultures en milieu T et des émulsions en eau physiologique contenant la même masse de germes, on obtient dans le premier cas des résultats incontestablement moins bons. Ce qui prouve que les pneumocoques, au cours du développement, donnent naissance à des substances qui gênent leur agglomération par les sérums. De plus, ces substances varient quantitativement d'un échantillon à l'autre, d'où une absence de parallélisme frappante entre les séries d'« expériences-milieu T » et les séries d'« expériences-émulsions » correspondantes.

Nous allons rapporter, successivement, les résultats de nos études sur l'agglutinabilité des *pneumocoques* et le pouvoir agglutinant des sérums (des malades).

(1) C'est par suite d'un lapsus que, dans notre premier travail (ces *Annales*, juin 1911, p. 486), le chiffre 4 centigrammes s'est trouvé substitué à la valeur exacte : 12 centigrammes.

AGGLUTINABILITÉ DES PNEUMOCOQUES.

Pour apprécier le degré d'agglutinabilité de nos échantillons, nous les avons soumis tout d'abord à l'action des sérums équins et ovins normaux, puis à l'action du sérum équin « immun » et du sérum ovin « immun ».

SÉRUMS ÉQUINS NORMAUX. — *Ils agglutinent la majorité des échantillons.* Cette propriété est-elle inhérente au sérum du cheval, ou provient-elle d'infections antérieures? Rien n'autorise à admettre la dernière hypothèse, car il semble que les affections pneumococciques et, en particulier, la pneumonie lobaire aiguë franche soient bien rares chez les équidés.

SÉRUM DU CHEVAL IMMUNISÉ. — Un seul, parmi nos échantillons inagglutinables par le sérum normal, a été agglutiné par le sérum « immun » : rien de singulier, puisqu'il s'agit de l'échantillon A, utilisé pour l'immunisation (1). Parmi les pneumocoques déjà agglutinables par le sérum normal, les uns l'étaient davantage par le sérum « immun », les autres au même degré, d'autres moins. Fait encore plus curieux : certains échantillons se sont montrés agglutinables par le sérum normal et point du tout par le sérum « immun ». La manière dont nos expériences ont été conduites et l'identité des résultats, obtenus à plusieurs mois d'intervalle, ne sauraient laisser *aucun doute* sur l'existence de ce phénomène paradoxal.

Notons que des colonies séparées, venant d'un même malade, voire d'un même produit, peuvent se comporter d'une façon différente vis-à-vis des sérums équins, normaux et « immun ». Exemples : 2 colonies du sang sont également agglutinables par les sérums *n.* et *i.*, une colonie du pus périrénal est inagglutinable par ces sérums, — une colonie du sang est également agglutinable par les sérums *n.* et *i.*, une colonie du pus méningé n'est agglutinable que par le sérum *n.*, — une colonie du sang est également agglutinable par les sérums *n.* et *i.*, une autre n'est agglutinable que par le sérum *n.* seul. (Dans tous ces exemples, il s'agit de pneumocoques humains.)

SÉRUMS OVINS NORMAUX. — *Ils n'agglutinent qu'une faible minorité des échantillons.* (De même pour les sérums humains normaux, soit dit par anticipation.)

(1) En rigueur, l'échantillon A se montre *légèrement* sensible au sérum normal (*infinitement plus* au « sérum A »).

SÉRUM DU MOUTON IMMUNISÉ. — 8 échantillons, inagglutinables par le sérum normal, ont été agglutinés par le sérum « immun » ; parmi eux, bien entendu, le pneumocoque A. Aucun des échantillons agglutinables par le sérum normal ne l'était par le sérum « immun » ; nous garantissons, ici encore, l'exactitude des expériences.

Donnons, à nouveau, des exemples montrant la façon différente dont peuvent se comporter les colonies provenant d'un même malade, voire d'un même produit (pneumocoques humains, — on a choisi *les mêmes cas que tout à l'heure*.) 2 colonies du sang ne sont agglutinables que par le sérum « immun », une colonie du pus périrénal est inagglutinable par ce sérum, — une colonie du pus méningé n'est agglutinable que par le sérum normal, une colonie du sang est inagglutinable par les sérums *n.* et *i.*, — une colonie du sang n'est agglutinable que par le sérum *i*, une autre est inagglutinable par les sérums *n.* et *i*.

Il n'existe *aucun rapport* entre la façon dont un échantillon se comporte vis-à-vis des sérums équins (normaux et « immun ») et des sérums ovins (normaux et « immun »), pas plus que vis-à-vis des sérums humains (normaux). Toutefois, un nombre assez grand de pneumocoques demeurent inagglutinables *dans tous les cas*.

Nous nous trouvons en présence de variétés individuelles qui semblent échapper à toute règle et qui n'affectent de relations ni avec l'*origine* des échantillons (homme, lapin, cobaye, cheval), ni avec leur *virulence*.

CONCLUSIONS. — Le diagnostic des pneumocoques par le critérium de l'agglutinabilité (méthode des mélanges) semble bien précaire. Il conviendra dorénavant de s'adresser au mouton (et non au cheval) pour obtenir un sérum réactif et de pousser *encore plus loin* l'immunisation. On évitera ainsi de verser dans la préparation de sérum bi- ou multivalents, laquelle, *au point de vue diagnostique*, nous paraît une véritable pétition de principe.

POUVOIR AGGLUTINANT DES SÉRUMS (DES MALADES).

Nous avons fait agir les trente-huit sérums de nos malades, recueillis à diverses périodes de l'infection (parfois avant et après la crise, dans les pneumonies franches), d'une part sur

les pneumocoques correspondants, d'autre part sur deux échantillons humains inagglutinables par les sérums normaux (équins, ovins et humains), l'un avirulent, l'autre hypervirulent pour la souris.

ACTION SUR LES PNEUMOCOQUES CORRESPONDANTS. — Les *résultats* ont été *positifs dans un quart des cas* environ ; il s'agissait, constamment, d'échantillons inagglutinables par les sérums humains normaux. Inversement — et nous retrouvons ici encore le paradoxe déjà mentionné — certains échantillons, agglutinables par les sérums normaux, ont résisté aux sérums des malades dont ils provenaient.

ACTION SUR LES DEUX ÉCHANTILLONS INAGGLUTINABLES. — *Résultats nuls*, sauf pour un sérum et un échantillon (le pneumocoque hypervirulent).

CONCLUSIONS. — Le diagnostic des infections humaines à pneumocoques par la recherche du pouvoir agglutinant des sérums (méthode des mélanges) ne comporte guère de valeur pratique, *même en s'adressant aux germes homologues*. C'est d'ailleurs ce qu'admet implicitement la majorité des auteurs.

A PROPOS

DE LA NEUTRALISATION DE LA TOXINE TÉTANIQUE

PAR LA SUBSTANCE CÉRÉBRALE

par A. MARIE et M. TIFFENEAU

Si l'étude de la neutralisation des toxines microbiennes par certains principes constituants de la substance cérébrale offre un grand intérêt au point de vue de la pathologie nerveuse, on sait aussi que les résultats déjà acquis sur cette question ont servi à étayer une théorie de l'immunité, celle des chaînes latérales.

A la suite de nos recherches sur la neutralisation de la toxine tétanique, le professeur Ehrlich a tiré argument des résultats que nous avions obtenus pour affirmer une fois de plus que tout concordait à faire admettre « l'identité d'action des antitoxines et des récepteurs cellulaires » (1).

La question est donc d'importance et c'est en raison de ce double intérêt, présenté par l'étude de ces phénomènes de neutralisation, que nous avons entrepris (2) de déterminer la nature des substances qui, dans les centres, neutralisent la toxine tétanique. Nos conclusions avaient été les suivantes : pour une faible portion, environ 3 p. 100, le lipoïde complexe qu'est le protagon intervient dans la neutralisation de la toxine tétanique par la matière cérébrale des mammifères, la majeure partie (97 p. 100) de ce phénomène de neutralisation étant due à une substance dont nos recherches nous avaient permis d'affirmer la nature albuminoïdique. Toutefois, nous n'étions jamais parvenus à isoler cette substance albuminoïde, même en partant de l'encéphale du cobaye, l'espèce dont la matière nerveuse a, vis-à-vis de la toxine tétanique, les propriétés les plus fortement neutralisantes.

(1) *Munch. med. Woch.*, 1909, n° 50, p. 2386.

(2) *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXII, p. 289 et 644; et *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, t. LXX, p. 637.

Dans un travail paru récemment (1), MM. Guy Laroche et Grigault, après avoir confirmé nos recherches, signalent un mode d'extraction d'un albuminoïde du cerveau humain qui jouirait du *pouvoir de neutraliser jusqu'à cinq doses mortelles de toxine tétanique*.

Nous avons tenu à répéter leurs expériences sur des encéphales de la même espèce, en suivant exactement la technique des auteurs, laquelle ne diffère guère de celle employée sans succès par nous-mêmes dans nos travaux antérieurs.

La substance cérébrale est broyée et émulsionnée dans une solution de sel marin à 10 p. 100; après vingt-quatre heures de séjour à la glacière, on filtre et le liquide est précipité par le sulfate d'ammoniaque. On centrifuge après un repos convenable de la masse, et on additionne le dépôt, préalablement dialysé, de doses variables de toxine tétanique.

Voici, dans le tableau suivant, le résumé de quelques-unes de nos expériences.

ACTION DE L'EXTRAIT DE CERVEAU HUMAIN SUR LA TOXINE TÉTANIQUE

1 ^{er} Janvier 1912 (<i>Mélanges de 24 heures</i>)	9	10	11		
Souris 1, reçoit sous la peau 3 cent. cubes du précipité dialysé + 0,0025 cent. cubes toxine tétanique	≡	+			
Souris 2, reçoit 3 cent. cubes du précipité + 0,001 toxine.	≡	≡	+		
Souris 3, reçoit 3 cent. cubes d'eau physiologique + 0,001 toxine, soit 2 doses mortelles	≡	≡	+		
3 Février 1912	4	5	6	7	8
Souris 1, reçoit sous la peau 3 cent. cubes du précipité obtenu avec un autre cerveau humain + 0,0005 cent. cubes de toxine tétanique (1 d. m.).	0	—	≡	≡	≡ +
Souris 2, reçoit 3 cent. cubes de précipité + 0,0025 cent. cubes de toxine tétanique (5 d. m.)	—	—	≡	≡	≡ +

Comme on le voit d'après ce tableau, il ressort de nos expé-

(1) *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXV, p. 892.

riences que nous n'avons jamais constaté de neutralisation de la toxine tétanique par l'albuminoïde extrait du cerveau de l'homme, d'après le procédé de MM. Guy Laroche et Grigault : non seulement cette substance ne pouvait neutraliser cinq doses mortelles, mais elle s'est montrée absolument inactive même sur une dose mortelle de toxine tétanique.

Nous continuons donc à penser qu'on n'est pas encore parvenu à isoler du cerveau la substance albuminoïde à laquelle on accorde, à la suite de nos travaux, la plus grande part dans les propriétés antitétaniques de la matière nerveuse.

ERRATA

MÉMOIRE DE M. ALEXANDRE LEBEDEF

« Extraction de la zymase par simple macération ».

Page 12, ligne 1, *lire* : 0,5 cent., *au lieu de* : 5 cent.
Page 12, — 9, *lire* : 0,5 cent., *au lieu de* : 5 —
Page 24, 5^e colonne, ligne 15, *lire* : 20 cent.
Page 24, 5^e — ligne 16, *lire* : 2 —
Page 24, 5^e — ligne 17, *lire* : 3 —
Page 24, 5^e — ligne 34, *lire* : 2 —

Le Gérant : G. MASSON.

Paris. — L. MARETHEUX, imprimeur, 1, rue Cassette.